



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

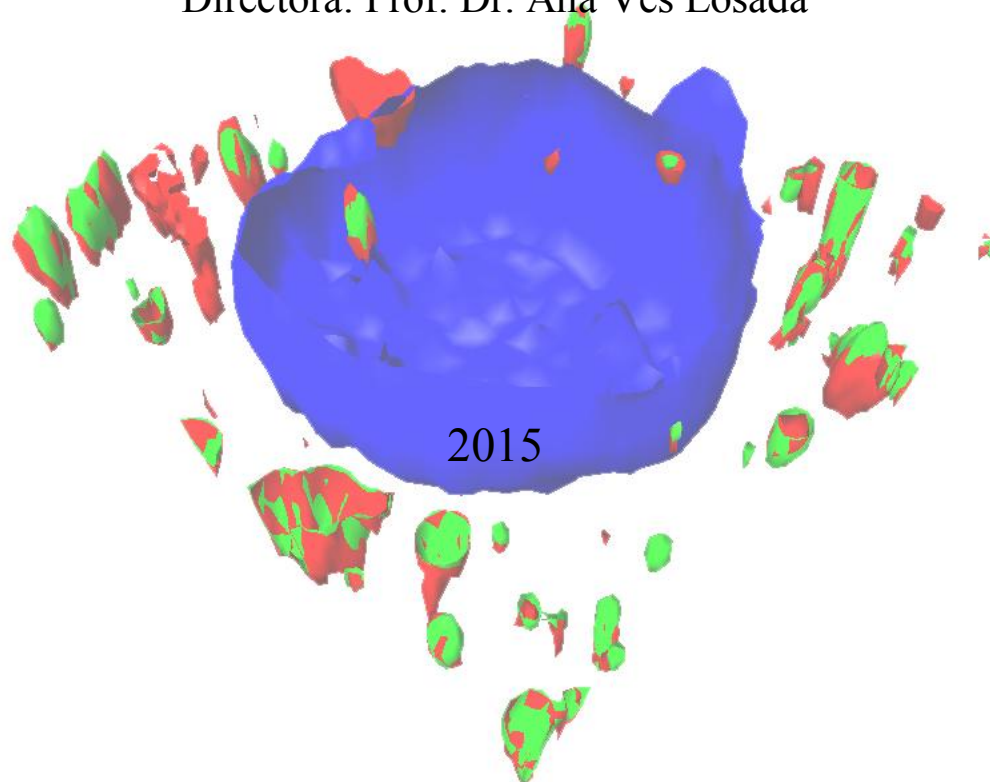
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

## **Metabolismo de las Gotas Lipídicas Nucleares**

Lic. Lucía Carolina Lagrutta

Directora: Prof. Dr. Ana Ves Losada



A mis papás, porque todo es posible gracias a su contención.

Porque siempre recibo una palabra de aliento,  
y por enseñarme que con esfuerzo, es posible llegar a la meta.

A Alejito, por ser mi compañero de vida,  
por llenar de alegría mis días,  
y por acompañarme durante toda esta etapa.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Horacio Garda quien, como Director del INIBIOLP, me permitió usar las instalaciones del Instituto confiando plenamente en mi persona.

A la Universidad Nacional de La Plata, y en particular, a la Facultad de Ciencias Exactas, por formarme y darme la oportunidad de seguir creciendo tanto profesionalmente, como persona.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme brindado los medios, mediante becas y subsidios, para la realización de este trabajo. A Boehringer Ingelheim Founds por haber financiado mi estadía en Barcelona, y brindarme la posibilidad de vivir una gran experiencia laboral y personal.

A Annie, por acompañarme y confiar en mí durante todos estos años. Por tantas charlas, risas compartidas y lindos momentos vividos. Con quien más allá de lo laboral, establecí una hermosa relación personal.

A Juan, quien fue mi compañero de laboratorio, y es un gran amigo. Por su simpleza, por enseñarme a trabajar en la mesada, y por ayudarme tantas veces que lo necesité. Porque es una de esas personas que la vida te pone en el camino y estas feliz de haber conocido.

A Seba, quien junto a Rosana, nos abrieron las puertas de su casa y nos trataron como si nos conociéramos desde toda la vida. Porque la estadía en Barcelona fue una de las experiencias más lindas y fructíferas de mi vida. Por transmitirme tantos conocimientos, por dejarme trabajar en el laboratorio libremente, y por escucharme y aconsejarme.

A Sandra, por ser parte de este predilecto grupo “a-vesicular”, porque el trabajo en el laboratorio no hubiese sido tan divertido sin su compañía. Por compartirme sus conocimientos, y por tantas risas, charlas de pasillo y divertidas anécdotas de congresos.

A los amigos del COEL, y a Maggie. Porque siempre que lo necesité, estuvieron para ayudarme. Por los lindos momentos compartidos, mates, charlas, y por alentarme en esta etapa final.

A mis Meninas, Chanchines y PO's, por haberme permitido saturar las charlas y reuniones con la palabra "Tesis", porque son las personas que me acompañan y me llenan de alegría, ellos me hacen ver que todo es más simple de lo que parece, y que siempre hay una solución. Gracias Gerito por ayudarme con la Tesis cuando lo necesité. Y gracias Andru, por tantos almuerzos, risas, y charlas compartidas, por transmitir siempre buenas vibras, me quedan los más lindos recuerdos de esta etapa final del doctorado.

A mi familia, por acompañarme día a día, porque constituyen un pilar fundamental en mi vida, esta Tesis se la dedico a ellos.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>9</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
2.1. ANATOMÍA DEL HÍGADO .....	14
2.2. EL NÚCLEO CELULAR .....	16
2.3. ¿CÓMO ES LA ORGANIZACIÓN ESPACIO-FUNCIONAL DEL NÚCLEO? .....	18
2.4. nLD: UN NUEVO DOMINIO NUCLEAR .....	19
2.4.1. Estructura y caracterización .....	19
2.4.2. Origen de las nLD.....	21
2.4.3. Funciones de las nLD .....	22
2.5. COMPOSICIÓN LIPÍDICA NUCLEAR .....	24
2.6. METABOLISMO LIPÍDICO NUCLEAR.....	25
2.7. GÉNESIS Y METABOLISMO DE LAS GOTAS LIPÍDICAS CITOSÓLICAS .....	27
2.7.1. Estructura y formación de las cLD .....	27
2.7.2. Proteínas asociadas con la formación y mantenimiento de las cLD.....	34
2.7.3. Relación entre cLD, ILD y VLDL .....	36
2.7.4. Crecimiento y desplazamiento de las cLD .....	37
2.7.5. Rol del complejo proteico SNARE en la fusión de cLD .....	37
2.7.6. Lipólisis de las cLD.....	39
2.7.7. Rol de las cLD en el metabolismo celular y su asociación con otros orgánulos .....	40
<b>3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>42</b>
<b>4. CAPÍTULO I: DINÁMICA DE LAS nLD .....</b>	<b>45</b>
4.1. CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA .....	47
4.1.1. Aislamiento de hepatocitos de rata .....	47
4.1.2. Cultivo de los hepatocitos aislados .....	48
4.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS LD EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA Y CÉLULAS HEPG2 .....	51
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS GOTAS LIPÍDICAS CITOSÓLICAS DE CÉLULAS HEPG2 .....	55

4.3.1. Aislamiento de cLD.....	55
4.3.2. Composición lipídica y contenido proteico de las cLD .....	56
4.3.3. Organización estructural de las cLD .....	57
4.4. EFECTO DEL ÁCIDO OLEICO Y TRIACSLIN C EN PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DE LD EN HEPATOCITOS DE RATA Y CÉLULAS HEPG2 .....	58
4.4.1. Efecto del Ácido Oleico.....	59
4.4.2. El efecto del AO es reversible.....	76
4.4.3. El AO determina modificaciones en el contenido lipídico celular.....	80
4.4.4. El efecto del AO involucra la síntesis de lípidos.....	82
4.5. DISCUSIÓN .....	86
<b>5. CAPÍTULO II: PROTEÓMICA DE LAS nLD .....</b>	<b>94</b>
5.1. AISLAMIENTO DE nLD DE NÚCLEOS CELULARES DE HÍGADO DE RATA.....	95
5.2. ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO DE LAS nLD .....	97
5.2.1. 1-D Electroforesis (SDS-PAGE) .....	97
5.2.2. 2-D Electroforesis.....	98
5.2.3. Identificación de proteínas por PMF MALDI-TOF MS .....	99
5.3. PROTEÓMICA DE LAS nLD MEDIANTE GeLC-MS.....	101
5.3.1. Protocolo de obtención del extracto proteico de nLD .....	101
5.3.2. GeLC-MS .....	104
5.4. CARBOXILESTERASA EN EL NÚCLEO CELULAR.....	123
5.4.1. Topología celular de la carboxilesterasa.....	123
5.4.2. Rol de la carboxilesterasa de las nLD en el metabolismo lipídico nuclear y celular	128
5.4.3. Análisis <i>in silico</i> de Ces1d de rata .....	134
5.5. DISCUSIÓN .....	141
<b>6. CONCLUSIONES FINALES .....</b>	<b>150</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>157</b>
7.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	158
7.1.1. Animales .....	158
7.1.2. Cultivo celular.....	159

7.2. FRACCIONAMIENTO CELULAR.....	163
7.2.1. Fraccionamiento a partir de células de hígado de rata.....	163
7.2.2. Fraccionamiento a partir de cultivo de células HepG2 .....	165
7.3. ANÁLISIS LIPÍDICO.....	166
7.3.1. Extracción de lípidos totales .....	166
7.3.2. Separación de clases lipídicas.....	167
7.3.3. Cuantificación de clases lipídicas .....	167
7.4. ANÁLISIS PROTEICO .....	168
7.4.1. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry .....	168
7.4.2. SDS-PAGE de fracciones celulares.....	169
7.4.3. Revelado de los geles .....	169
7.4.4. Western blot .....	170
7.4.5. 2-D Electroforesis .....	171
7.4.6. Proteómica de las gotas lipídicas nucleares .....	172
7.5. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA .....	175
7.5.1. Microscopía de campo claro .....	175
7.5.2. Microscopía de epifluorescencia.....	175
7.5.3. Microscopía de fluorescencia confocal .....	175
7.6. ANÁLISIS DE IMÁGENES .....	176
7.6.1. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia .....	176
7.6.2. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia confocal .....	177
7.7. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	177
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>179</b>

## ABREVIATURAS

**ACAT-1:** acil-CoA:colesterol aciltransferasa (*Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase*)

**ACSL:** acil-CoA sintetasa

**AO:** ácido oleico

**ApoB:** apolipoproteína-B

**BSA:** seroalbúmina bovina

**C:** colesterol

**CE:** ésteres de colesterol

**cLD:** gota/s lipídica/s citosólica/s

**CN:** cuerpos nucleares (*Nuclear Bodies*)

**CPN:** complejo del poro nuclear

**DAG:** diacilglicéridos

**DAGL:** diacilglicerol lipasa

**DGAT:** diacilglicerol-aciltransferasa

**DTT:** ditioneitol

**MN:** doble membrana nuclear

**ECHP:** *peroxisomal bifunctional enzyme*

**EN:** envoltura nuclear

**EM:** especies moleculares

**ER:** retículo endoplásmico

**FA:** ácido/s graso/s

**GeLC-MS:** digestión trípica *in-gel* seguida por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

**GPL:** glicerofosfolípidos

**hnRNP:** ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares

**HSP:** *heat shock proteins*

**LAL:** lipasa ácida lisosomal

**L-FABP:** Proteína transportadora de FA de hígado (*Liver Fatty Acid Binding Protein*)

**ILD:** cLD: gota/s lipídica/s del lumen del ER

**LN:** lípidos neutros

**LP:** lípidos polares

**Max:** máximo

**MADAG:** diacilglicéridos con una unión éter



**MAG:** monoacilglicéridos

**MAGL:** monoacilglicerol lipasa

**MALDI-TOF:** *Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*

**MNE:** membrana nuclear externa

**MNI:** membrana nuclear interna

**MO:** microscopía óptica de campo claro

**MS:** espectrometría de masas

**MUFA:** FA monoinsaturados

**N:** núcleo

**NAFLD:** enfermedad hepática grasa no alcohólica

**nLD:** gota/s lipídica/s nuclear/es

**PA:** ácido fosfatídico

**PC:** fosfatidilcolina

**PE:** fosfatidiletanolamina

**PI:** fosfatidilinositol

**PLIN1:** perilipina1

**PMF:** huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*)

**PPAR:** *peroxisomal proliferator activator receptor*

**PS:** fosfatidilserina

**PUFA:** FA polinosaturados

**RN:** retículo nucleoplásmico

**SL:** esfingolípidos

**SM:** esfingomielina

**TAG:** triacilglicéridos

**TC:** Triacsin C

**TLC:** cromatografía en capa delgada

**VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad

# 1. RESUMEN

Los lípidos en el núcleo, al igual que en el resto de la célula, son moléculas muy versátiles que poseen un activo metabolismo e importantes funciones biológicas que abarcan roles estructurales, energéticos, y en la regulación celular, en procesos de señalización actuando como segundos mensajeros. Los lípidos nucleares se encuentran en dos localizaciones muy contrastantes, la envoltura nuclear, más fluida que el interior nuclear y compuesta de glicerofosfolípidos (GPL), esfingolípidos (SL) y colesterol (C); y dentro del núcleo, en las Gotas Lipídicas Nucleares (nLD), donde se encuentran concentrados todos los triacilglicéridos (TAG) y éster de colesterol (CE) nucleares, organizados en un core hidrofóbico rodeado de una monocapa de lípidos polares (LP), C y proteínas asociadas.

El objetivo de este trabajo fue dilucidar el metabolismo y las funciones biológicas de los lípidos nucleares. Determinar la proteómica y la topología de los dominios lipídicos nucleares.

Se utilizó como modelo experimental el cultivo primario de hepatocitos de rata y las células HepG2, y se evaluó a las nLD en forma comparativa con las Gotas Lipídicas Citosólicas (cLD) en una misma célula. Se aislaron nLD y cLD por sedimentación en gradiente de sacarosa. Se cuantificaron parámetros morfológicos de nLD y cLD a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia mediante el software Image-Pro plus. Se utilizó como estímulo externo del metabolismo lipídico y de las LD, al ácido oleico (AO) en distintos protocolos experimentales. La composición lipídica se determinó mediante análisis bioquímicos tradicionales. Se diseñó una importante herramienta metodológica para abordar el estudio de proteómica de las nLD mediante la técnica de GeLC-MS. La muestra de nLD debió ser previamente concentrada y fue necesario eliminar los interferentes presentes, ya que las nLD constituyen una muestra compleja con baja cantidad de proteínas, y están formadas por lípidos neutros, que son moléculas hidrofóbicas que dificultan su análisis. Algunas de las proteínas identificadas en el subproteoma de las nLD ya habían sido descritas en asociación a las cLD, y otras fueron descritas por primera vez en el núcleo celular. Dentro de las proteínas descritas, algunas poseen funciones estructurales, enzimáticas, otras constituyen factores de transcripción y marcadores de cáncer. Se identificaron dos proteínas asociadas al metabolismo lipídico, Ces1d (Carboxilesterasa 1d) y ECHP (*peroxisomal bifunctional enzyme*), involucradas en los procesos de lipólisis y de  $\beta$ -oxidación lipídica, respectivamente,

que no habían sido descritas hasta el momento en el núcleo celular. Teniendo en cuenta que Ces1d aun no ha sido cristalizada, se realizó un estudio *in silico*, y se predijo su estructura 3-D utilizando como molde su ortólogo humano CES1. El 95% de los residuos de Ces1d fueron modelados con más de un 90% de confianza. Mediante el alineamiento de secuencias, fue posible predecir además, la posición de potenciales sitios de interés asociados a la función, localización y estructura de Ces1d.

En este trabajo se demostró que las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico cuyas características morfológicas y composición responden en forma reversible a estímulos externos, como el ácido oleico. Estos resultados implican que las nLD estarían participando activamente en procesos que se desarrollan dentro del núcleo.

En particular, se demostró que las células frente al estímulo externo de AO responden activando las rutas anabólicas que determinan un aumento en el número y tamaño de las LD en las poblaciones de cLD y nLD, a través de mecanismos de incorporación de lípidos neutros sintetizados *de novo* y de fusión de gotas existentes de menor tamaño. El fenotipo anabólico desencadenado por el AO se revierte al eliminar el estímulo del medio y se activan entonces, los procesos catabólicos de la célula que involucran un mecanismo de fisión de gotas grandes en gotas de menor tamaño. Estos procesos catabólicos incluirían la lipólisis y posterior oxidación de los lípidos neutros (LN) de las LD que disminuirían de tamaño por reducción de sus componentes y se iniciarían con la translocación de la Ces1d desde el citosol y la matriz nuclear hacia las cLD y nLD, respectivamente. La Ces1d presente en las nLD y las cLD, posee un activo rol en este proceso, hidrolizando TAG y CE. Los ácidos grasos (FA) liberados de la hidrólisis de los lípidos de las nLD por acción de la Ces1d, se unirían a la L-FABP (*liver fatty acid binding protein*) en la matriz nuclear, y translocarían a sitios de  $\beta$ -oxidación nuclear y/o citosólicos, y finalmente serían oxidados. Así mismo, los FA liberados en la matriz nuclear podrían unirse como ligandos, a factores de transcripción nucleares y participar en la regulación de estos mismos procesos.

Las nLD no serían estructuras inmóviles nucleares sino que podrían desplazarse utilizando actina y miosina, actuando así como un sistema de *delivery* y de recepción de lípidos y de proteínas dentro del núcleo.

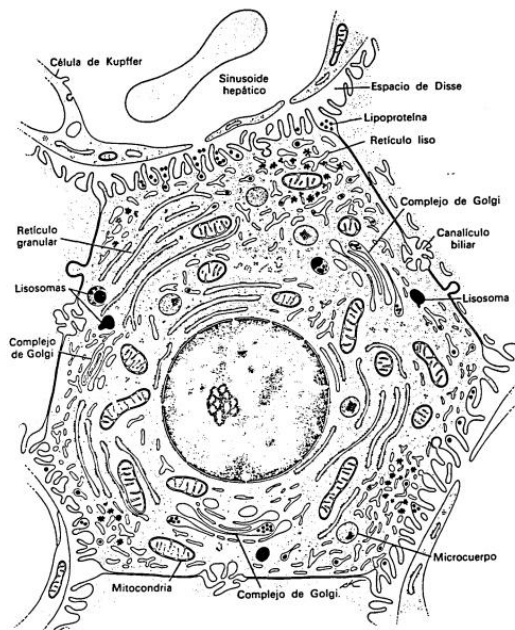
A partir de los resultados de este trabajo, las nLD deben ser consideradas como un importante dominio nuclear a tener en cuenta, ya que seguramente están participando en muchos de los eventos que se desarrollan en el núcleo, además de los directamente relacionados con la homeostasis lipídica, tanto en condiciones normales como patológicas.



## 2.1. ANATOMÍA DEL HÍGADO

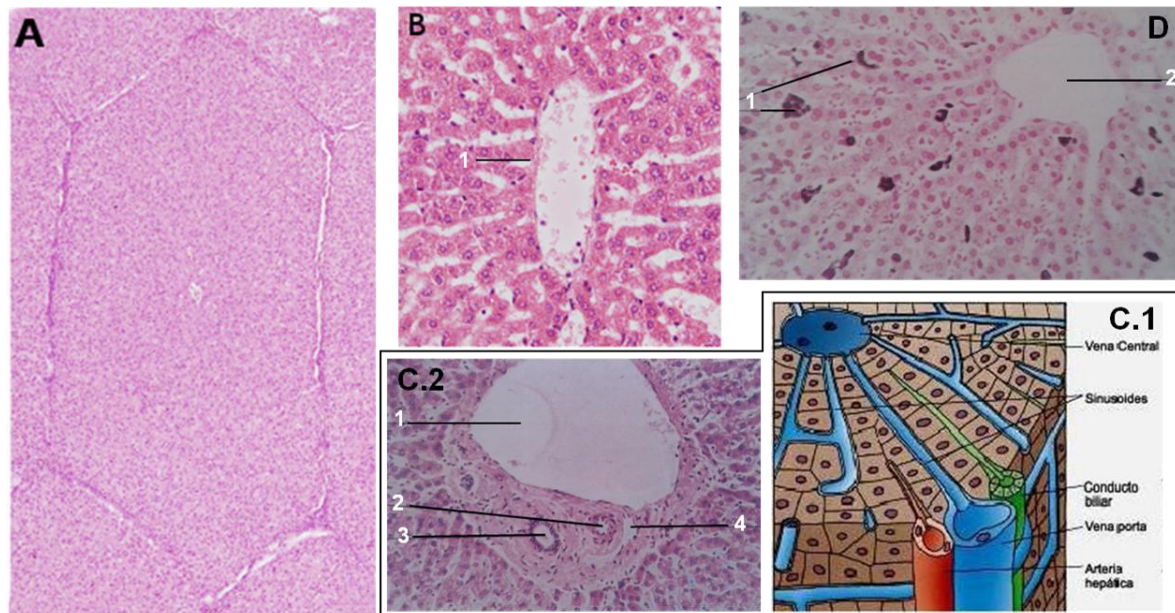
El hígado es la glándula, órgano, o víscera más grande del cuerpo. Está situado bajo el diafragma y protegido por las costillas, y lo recubre una cápsula de tejido conectivo fibroso que penetra en el órgano para formar tabiques que lo dividen en lóbulos y lobulillos. La formación del hígado se produce a partir de una invaginación del tubo digestivo durante el desarrollo embrionario, por lo tanto tiene un origen epitelial. Una gran parte de la sangre que llega al hígado proviene de la vena porta que recoge los productos de la digestión que han sido absorbidos. Esta fuerte irrigación sanguínea es lo que hace que tengan un color rojizo [1].

Los hepatocitos son las células que forman la mayor parte del hígado, constituyen alrededor del 70% de la población total del tejido hepático, y son las principales células responsables de la función hepática. Los hepatocitos se caracterizan por ser células poliédricas con 1 ó 2 núcleos esféricos centrales o excéntricos ([Figura 1](#)).



**Figura 1. Estructura del hepatocito.** Esquema del hepatocito con su forma poliédrica característica y las relaciones con su entorno (Fawcett, 1987).

La unidad estructural del hígado es el lobulillo vascular, cuyas dimensiones oscilan entre los 1,5 a 2 mm de longitud y 1 a 1,2 mm de ancho aproximadamente. En los cortes transversales los lobulillos aparecen como regiones poligonales, que con frecuencia se comparan con las celdas de un panel de abejas ([Figura 2A](#)) [2].



**Figura 2. Anatomía del tejido hepático.** **A)** Unidad morfológica del hígado: lobulillo vascular. (Aumento 40X. Coloración: Hematoxilina-Eosina). **B)** 1: Vena centrolobulillar, atraviesa el lobulillo vascular. Los hepatocitos se disponen radialmente con respecto a esta. (Aumento 120X. Coloración: Hematoxilina-Eosina). **C)** Tríada hepática. **C.1)** Representación de tejido hepático en la que se observa el lobulillo vascular, la vena central, los sinusoides y los componentes de la tríada hepática: el conducto biliar, una rama de la vena porta y una rama de la arteria hepática. **C.2)** Corte a través del triángulo de Glisson. 1: rama de la vena porta (vena interlobulillar). 2: rama de la arteria hepática (arteria interlobulillar). 3: conducto biliar. 4: vaso linfático. (Aumento 120X. Coloración: Hemalumbre-Eosina). **D)** 1: Células de Kupffer. 2: vena central. (Aumento 300X. Coloración: Girond-Leblond).

Por el centro de estos lobulillos corre la vena centrolobulillar, respecto de la cual los hepatocitos se organizan radialmente hacia la periferia en placas celulares ([Figura 2B](#)). Entre ellos se sitúan capilares sanguíneos hepáticos (sinusoides), de manera que las células hepáticas se hayan bañadas por sangre al menos en dos de sus caras. Estos lobulillos están rodeados por abundantes fibras de tejido conjuntivo que, en los puntos de confluencia de los vértices lobulillares se despliegan formando cuñas, los triángulos de Glisson ([Figura 2C.1 y C.2](#)). En las cuñas conjuntivas se encuentran habitualmente las secciones de ramas de la vena porta, ramas de la



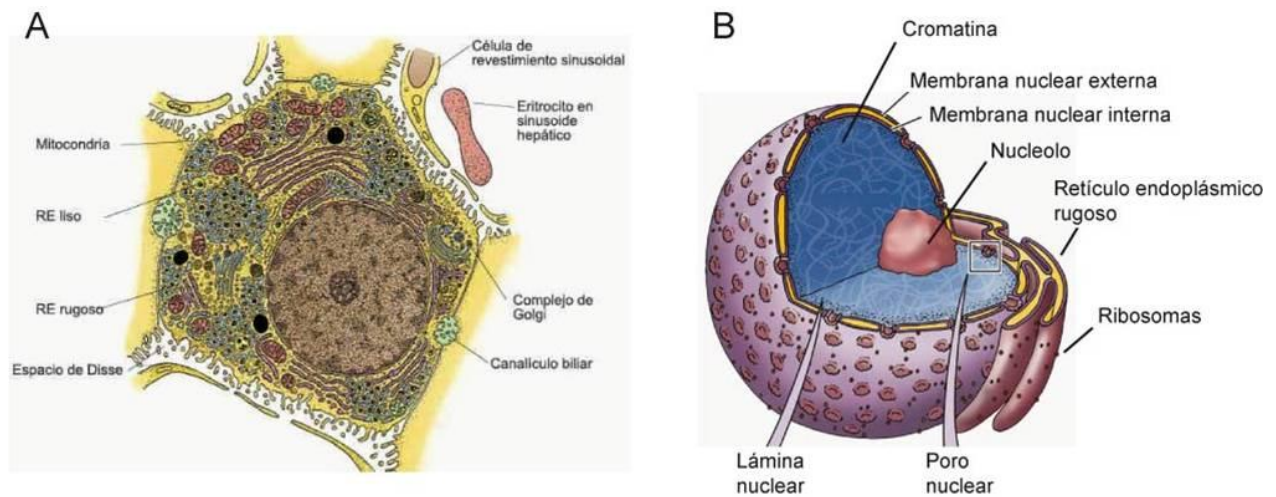
arteria hepática propia y conductos biliares (“tríada”). La superficie interna de las sinusoides hepáticas está formada por un endotelio fenestrado. Las células de von Kupffer son células fijas de este revestimiento (Figura 2D). Estas células son capaces de fagocitar y presentan prolongaciones citoplasmáticas muy largas que a veces atraviesan toda la sinusoide.

## 2.2. EL NÚCLEO CELULAR

*El núcleo es una de las características distintivas que definen a las células del dominio Eukarya.*

El núcleo es el principal reservorio del patrimonio genético de la célula eucariota, en su interior se llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción, entre otros. El núcleo es el organoide más grande de las células eucariotas y presenta una geometría de tipo esferoidal con un diámetro aproximado de 10  $\mu\text{m}$ . Está delimitado por la envoltura nuclear (EN), la que está compuesta por una red de filamentos intermedios (lámina nuclear), y dos membranas, la membrana nuclear interna (MNI) y la externa (MNE), respectivamente. La MNI interacciona con la lámina a través de proteínas de unión (por ejemplo la LAP2 $\beta$ ) y la MNE presenta continuidad con el retículo endoplásmico (ER) rugoso; el espacio entre ambas membranas presenta continuidad con el lumen del ER (Figura 3) [3], [4].

La comunicación y transporte de moléculas entre el núcleo y el citosol es continua, bidireccional y selectiva, y se realiza principalmente a través del complejo del poro nuclear (CPN). En la superficie del núcleo de una célula de mamífero pueden hallarse entre 3000 y 4000 CPN y cada uno está formado por más de 30 proteínas diferentes (nucleoporinas) [5]. El CPN consta de uno o más canales acuosos de 9 nm de diámetro y 15 nm de longitud, a través de los cuales moléculas pequeñas como por ejemplo proteínas de menos de 60 kDa pueden difundir en forma pasiva. Para las moléculas de mayor tamaño existe un sistema de transporte activo mediado por señales de localización nuclear (específicas para la importación y la exportación, respectivamente) [6].



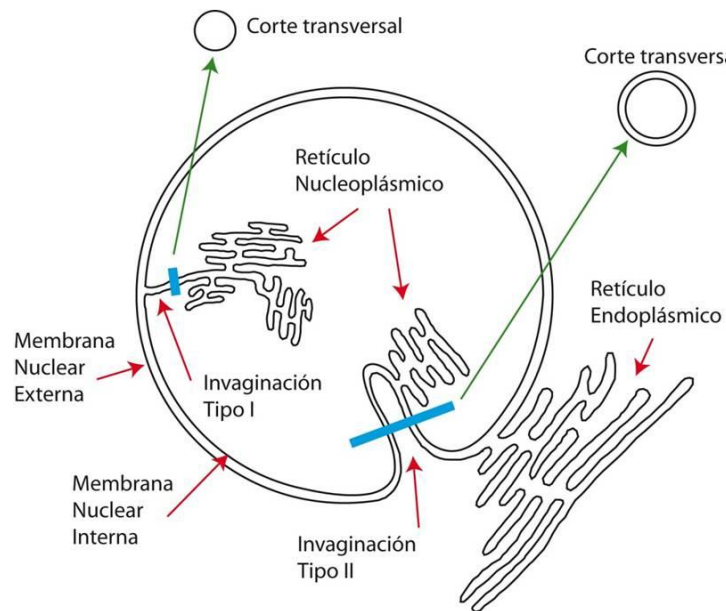
**Figura 3. Esquema del núcleo celular. A)** Representación de tejido hepático en la que se observa un hepatocito con el núcleo en la zona inferior derecha del mismo (Adaptada de: *Cell Fine Structure: An Atlas of Drawings of Whole-Cell Structure*. Saunders WB, 1971). **B)** Representación 3D de un núcleo aislado con sus principales componentes y la relación de continuidad con el retículo endoplásmico rugoso (Adaptada de: *Life: The Science of Biology*, 7th edition, Sinaguer Associates and Freeman WH & Co., 2004).

En algunas condiciones, la envoltura nuclear presenta invaginaciones hacia el interior nuclear constituidas por la MNI (Tipo I) o por ambas membranas MNI y MNE (Tipo II); el conjunto de las invaginaciones da lugar al retículo nucleoplásmico (RN) (Figura 4) [7]. Una diferencia importante entre ambos tipos de invaginaciones es que sólo las Tipo II poseen poros nucleares [8]. El RN se encuentra presente en una gran variedad de células animales [9] y vegetales [10]; y se encuentra particularmente desarrollado en condiciones patológicas [11].

La dinámica del RN es variada. Las invaginaciones pueden generarse luego de la mitosis si la sincronía entre la descondensación de los cromosomas y la fusión de los fragmentos de membrana es imperfecta, y en consecuencia la cromatina unida a cisternas de EN/ER queda atrapada en espacios intersticiales, como se observa en células de tabaco [12]. Existen ejemplos en los que las invaginaciones se forman *de novo* sin necesidad de que ocurra mitosis, perduran durante la interfase e incluso presentan patrones de herencia [8].

Si bien en la actualidad la existencia de invaginaciones está perfectamente probada, se desconoce su función precisa. En este sentido se propone que las invaginaciones extienden las funciones de la EN hacia el interior del núcleo,

permitiendo una mejor eficiencia de los procesos nucleares al acercar los componentes citoplasmáticos a los del interior nuclear. En el RN se localizarían los componentes de los mecanismos de la señalización mediada por calcio [13], [14] y algunos de los componentes del transporte y del metabolismo lipídico nuclear.

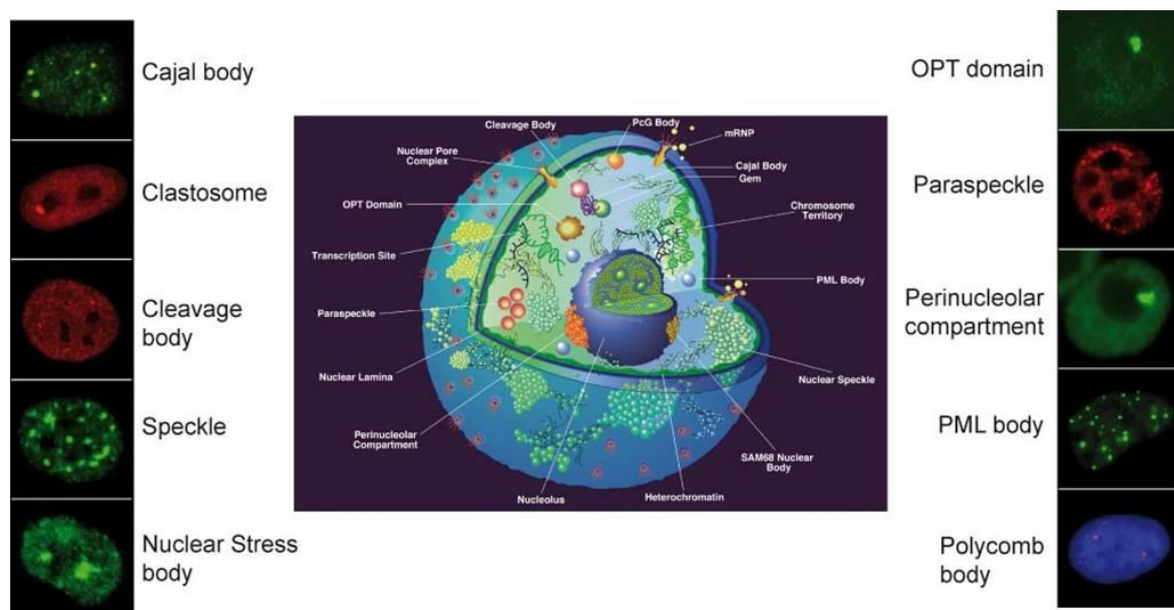


**Figura 4. Retículo nucleoplásmico.** En la representación se pueden apreciar las membranas nucleares (externa e interna), los dos tipos de invaginaciones que pueden observarse (Tipo I y II) y los puntos posibles de generación de los retículos nucleoplásmico y endoplásmico.

### 2.3. ¿CÓMO ES LA ORGANIZACIÓN ESPACIO-FUNCIONAL DEL NÚCLEO?

El núcleo es un organoide muy dinámico cuyo interior, la matriz nuclear, está compartimentalizada espacial y funcionalmente. La matriz está circunscripta por la envoltura nuclear y alberga además de la cromatina, una gran cantidad de estructuras supramoleculares llamadas cuerpos nucleares (CN: Nuclear Bodies) (Figura 5). En la actualidad hay identificados y descritos aproximadamente doce CN. En los CN se llevan a cabo funciones específicas, como la síntesis y procesamiento del RNA preribosomal (*nucléolo*), el almacenamiento y ensamblado de los componentes del splicing y en determinadas condiciones, el almacenamiento de CCT $\alpha$  (*CTP-fosfocolin citidiltransferasa*) [15] (*speckles*), o el almacenamiento de moléculas de RNA (*paraspeckles*), entre otros. Los CN están constituidos por un conjunto de proteínas específicas y no se encuentran delimitados por una membrana

como en el caso de los organoides citoplasmáticos; la cohesión estructural se debería a interacciones proteína-proteína y proteína-RNA. En cuanto a su morfología, si bien muchos CN son esféricos, existen otras formas características. El tamaño y el número de los CN es variado, el *nucléolo* es el que posee el mayor tamaño (2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro) y puede haber hasta tres copias por núcleo, mientras que los *corpúsculos de Cajal* poseen un diámetro menor a 1,5  $\mu\text{m}$  y se observan alrededor de 10 por núcleo [16].



**Figura 5. Cuerpos nucleares.** En el centro de la figura se observa una representación de un núcleo aislado y los diversos cuerpos nucleares en su interior. En los laterales pueden apreciarse imágenes de microscopía de fluorescencia de núcleos en los que se observan los diferentes CN utilizando las proteínas marcadoras de cada CN (Adaptado de [17]).

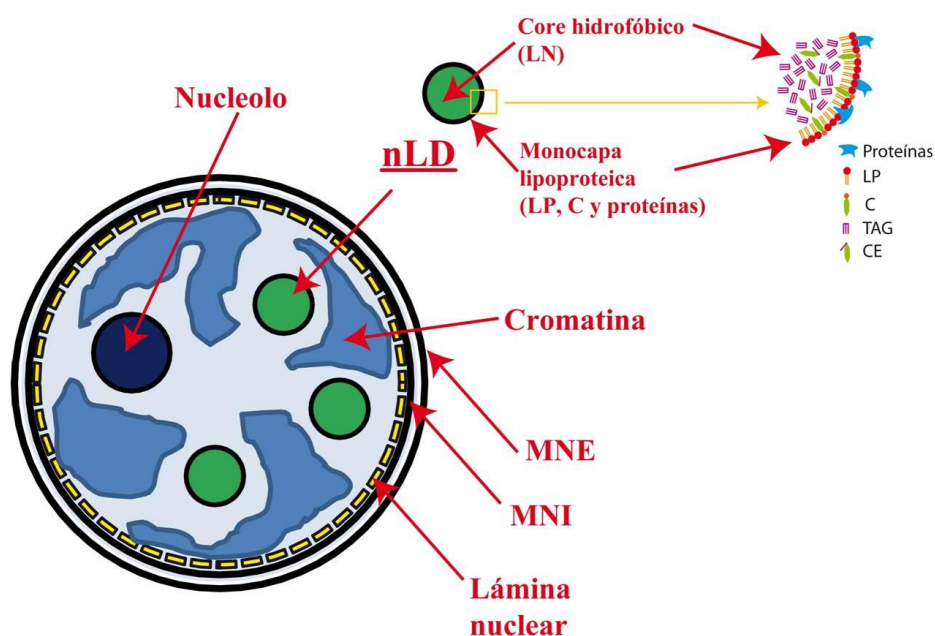
## 2.4. nLD: UN NUEVO DOMINIO NUCLEAR

### 2.4.1. Estructura y caracterización

En nuestro laboratorio se identificó un nuevo dominio nuclear, las Gotas Lipídicas Nucleares (nLD), que poseen características propias y diferentes a los otros dominios ya descritos en el núcleo (los cuerpos nucleares), ya que las nLD constituyen la primera estructura intranuclear delimitada por una monocapa lipoproteica [18]. Las nLD son estructuras supramoleculares que pueden ser

visualizadas dentro del núcleo previa coloración, como estructuras esféricas con un patrón aleatorio de distribución.

A partir de la existencia y caracterización de las nLD se demostró que los TAG y gran parte de los CE nucleares se localizan en las mismas, y solo una muy baja proporción de LP nucleares, ya que los LP se localizan mayoritariamente en la MN. Hemos propuesto que el modelo de organización de las nLD es semejante a las ya descritas cLD, y por lo tanto, las nLD estarían constituidas por una monocapa lipoproteica compuesta por LP, C y proteínas asociadas, y un core hidrofóbico constituido por TAG y CE (Figura 6).



**Figura 6. Esquema estructural del núcleo y de las nLD.** Representación esquemática del núcleo con los componentes de la envoltura nuclear (Lámina nuclear, Membrana Nuclear Interna (MNI) y externa (MNE)), y de las nLD con sus componentes químicos.

En base a un análisis comparativo realizado entre las nLD y las cLD, se observaron diferencias fundamentales en cuanto al tamaño y a la composición lipídica, ya que las nLD son más chicas que las cLD y representan un dominio nuclear muy pequeño, y las nLD poseen diferente proporción de LN que las cLD, siendo los LN mayoritarios los CE y los TAG en las nLD y en las cLD, respectivamente. Sin embargo es importante resaltar que la composición de FA de los TAG de ambos tipos de LD es similar [18]. En el hígado existe un patrón de órgano respecto de la composición de especies moleculares (EM) de fosfatidilcolina

(PC), que es el LP mayoritario de las estructuras celulares, ya que como se determinó anteriormente en el laboratorio, las especies moleculares de PC nuclear y endonuclear no solo son similares entre sí, sino que también a las de las demás fracciones celulares: homogenato, mitocondrias y ER. Este patrón de EM de PC se caracteriza por poseer un alto contenido de ácidos grasos insaturados, siendo el ácido araquidónico el más abundante [19].

Por lo tanto, la composición lipídica celular (LN y LP) sería compartida por las distintas estructuras en respuesta a una coordinación en la homeostasis lipídica celular.

En cuanto a la composición proteica de las nLD, la misma sería diferente a la de las cLD, ya que en el citosol las LD se caracterizan por estar constituidas en su mayoría por proteínas de la familia PAT, en tanto que en el laboratorio hemos determinado que las nLD no poseen Plin1 (perilipina1). Por su parte, tampoco se encontró la proteína ACAT-1 (*Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase*) en las nLD [18], que es una de las proteínas presente en las cLD [20].

#### 2.4.2. Origen de las nLD

La génesis de las nLD podría desarrollarse en el núcleo o en el citosol.

- 1) En el citosol: las LD se ensamblarían en el ER al igual que las cLD con componentes provenientes de la síntesis *de novo* y/o de procesos de hidrólisis, o del exterior celular mediante los mecanismos de endocitosis, que incluiría los aportados por la dieta.
  - Vías de ingreso de las nLD al núcleo:
    - En interfase se incorporaría a través del complejo del poro nuclear.
    - En telofase al finalizar la mitosis y rearmarse la membrana nuclear, las cLD quedarían encerradas dentro de la matriz nuclear y luego su composición se modificaría con las características diferenciales de las nLD.



2) En el núcleo: las nLD se ensamblarían a partir de componentes:

- Sintetizados en el citosol y luego importados al núcleo, de componentes parcialmente ensamblados en el citosol que completarían su maduración dentro del núcleo.
- Síntesis *de novo* en el núcleo. Esto podría llevarse a cabo en:
  - Dominios específicos dispersos en la matriz nuclear.
  - En asociación con la MNI.
  - En asociación con la MNE que posee ribosomas y continuidad con el RE.

Ambos mecanismos podrían no ser excluyentes uno del otro, y las nLD incorporadas al núcleo podrían sufrir modificaciones por ensamblado (citoplasmático o nuclear), incorporando o liberando al entorno lípidos y proteínas.

#### 2.4.3. Funciones de las nLD

Las nLD estarían involucradas en la homeostasis lipídica y en el interior nuclear servirían como un sistema buffer capaz de aportar o incorporar en forma rápida proteínas y lípidos involucrados en vías de señalización, aportando ligandos (FA, diacilglicéridos (DAG), LP, etc) para los factores de transcripción, y sustratos y enzimas del metabolismo lipídico que se desarrolla dentro del núcleo.

Las nLD no serían estructuras inmóviles nucleares sino que podrían desplazarse dentro del núcleo utilizando un andamiaje de actina, y a las miosinas como proteínas motoras del proceso, puesto que estas moléculas han sido ya descritas dentro del núcleo celular [21]. De esta manera, las nLD actuarían como un sistema de *delivery* de lípidos y de proteínas dentro del núcleo.

En el laboratorio se demostró que dentro del núcleo los FA exógenos se esterifican y remodelan en LN y LP mediante un mecanismo acil-CoA dependiente, donde la esterificación del C se realizaría a través de una isoforma diferente a la ACAT-1, dado que esta enzima no estaría presente en el núcleo celular [18].

Dadas las características estructurales de las nLD, éstas brindan en el interior nuclear un sitio adecuado donde pueden reclutarse moléculas hidrofóbicas en

general, así como también, proteínas involucradas en los distintos procesos nucleares.

Teniendo en cuenta que las cLD están implicadas en forma directa o indirecta en diferentes procesos de la salud humana (infecciones, procesos patológicos y toxicológicos) las nLD también podrían tener implicancias similares a las que poseen las cLD. A continuación se enumeran algunos de dichos procesos:

**1) Infecciones:** Las cLD están implicadas en el proceso de infección de los virus de Hepatitis C [22], [23] y Dengue [24], [25]. En estos procesos ciertas proteínas virales se acumulan en las cLD o en la zona del ER de la que se generan las LD.

En infecciones con *Micobacterium tuberculosis* y *leprae*, y con *Chlamydia pneumoniae* los macrófagos infectados acumulan gran cantidad de TAG en sus LD [26].

**2) Procesos patológicos:** *Cáncer:* el núcleo de las células cancerosas está muy modificado, observándose numerosas y amplias invaginaciones; resta determinar qué ocurre con las nLD en esos casos [11], [27], [28].

*Síndrome metabólico:* se ha encontrado que la falta de proteínas de la familia de las perilipinas provoca insulinoresistencia y afecta múltiples pasos en la vía de señalización de la insulina [29].

*Cirrosis:* el aumento en la síntesis de FA en los hígados de enfermos alcohólicos sumado a la disminución en la capacidad del hígado de oxidar estos compuestos puede llevar a una síntesis aumentada de TAG y a la acumulación de éstos en las cLD. Se encontró en ratas alimentadas con etanol un aumento en la expresión de ADRP1 en asociación con hepatoesteatosis [30].

**3) Toxicológica:** los efectos de los contaminantes en los seres vivos están a menudo asociados a un desbalance en el metabolismo de FA y una acumulación de LN en forma de cLD que luego son incorporadas en el sistema lisosomal. Esta acumulación se ha observado en las glándulas digestivas de almejas y en hepatocitos de pescados y ha servido como un adecuado biomarcador de estrés en estas células [31]. Es posible que también se observe acumulación de LN a nivel nuclear en las nLD de estos organismos.

Es evidente que las nLD conforman una nueva área del conocimiento con vastas implicancias tanto en fisiología como en relación a la salud humana.



## 2.5. COMPOSICIÓN LIPÍDICA NUCLEAR

El núcleo está constituido por LP (GPL y SL), y LN (C, CE, DAG, TAG y FA) [32]–[35], siendo los lípidos polares los mayoritarios.

Anteriormente no se había realizado un estudio sistemático y riguroso de la composición y la ubicación de los lípidos en el núcleo, en particular en el interior nuclear. Se había propuesto que en la matriz nuclear los LP se encontraban asociados al ARN en zonas de cromatina descondensada y/o como complejos lipoproteicos [36], [37]. Con respecto a los LN nucleares, los datos eran muy preliminares sin determinaciones rigurosas. Esto se debía en parte, a que la sensibilidad de las determinaciones no era suficiente dada la baja concentración de los lípidos presentes en la matriz nuclear y las limitaciones metodológicas que impedían obtener fracciones subnucleares puras.

En nuestro laboratorio se determinó la composición lipídica de núcleos aislados de hígado de rata, y en fracciones subnucleares (matrices nucleares aisladas: núcleos los que se les eliminó la doble membrana nuclear) [18]. A partir del mismo se pudo concluir que en el núcleo los lípidos se encuentran en dos localizaciones principales, en la envoltura nuclear (94% de los LP totales del núcleo) compuesta de GPL, SL y C; y dentro del núcleo, en la matriz nuclear, enriquecida en LN (TAG y CE) que se localizan en las nLD [18].

A partir de la existencia y caracterización de las nLD en el laboratorio, se demostró que los TAG y gran parte del CE nucleares se localizan en las nLD, y solo el 30% de los LP de la matriz se localizan en la monocapa de las nLD. Por lo tanto, el 70% restante de los LP de la matriz deben estar formando parte de otros dominios lipídicos endonucleares. Estos cálculos son concordantes con la bibliografía [36], en los que se demuestra que existen LP en asociación con la cromatina en fracciones aisladas de núcleos de rata, y por lo tanto, podemos suponer que al menos parte de los LP de la matriz que no se localizan en las nLD estarían en la cromatina. Los *spekles* constituirían otro dominio nuclear donde podrían encontrarse parte de los LP restantes de la matriz, ya que Favale y col. [15] han demostrado que en determinadas condiciones, la CCT $\alpha$  que participa en la síntesis de PC, transloca entre la membrana nuclear y los *speckles*.

## 2.6. METABOLISMO LIPÍDICO NUCLEAR

Trabajos previos del laboratorio han demostrado que el núcleo se caracteriza por poseer una elevada proporción de PUFA (ácidos grasos polinosaturados), principalmente 20:4n-6 y 22:6n-3 esterificados en sus lípidos [38]. Estos resultados revirtieron lo que proponía Hunt et al. [39] y se aceptaba en bibliografía, que en la matriz nuclear se concentraban LP, principalmente especies moleculares de PC ricas en FA saturados y 18:1n-9. Más aún, se demostró que en la matriz nuclear de células de hígado [18], existen especies moleculares ricas en 18:1n-9 pero las mismas corresponden a especies moleculares de TAG y de CE que se localizan en las nLD y no de especies moleculares de PC como proponía Hunt et al.

El núcleo posee un metabolismo lipídico activo y autónomo. En el laboratorio se determinó que los FA mayoritarios que constituyen los LN nucleares (16:0, 18:1n-9 y 18:2n-6) se incorporan por un mecanismo acil-CoA independiente en el núcleo (que podría ser mediado o no) y se esterifican por un mecanismo acil-CoA dependiente; la esterificación de estos FA se caracteriza por ser más activa (mayor actividad específica) en LN que en LP. Resultados equivalentes se observaron al aislar nLD de núcleos previamente marcados luego de incubarlos con estos  $[C^{14}]$  FA, ya que los  $[C^{14}]$ LN nucleares se localizaron en las nLD (Figura 7).

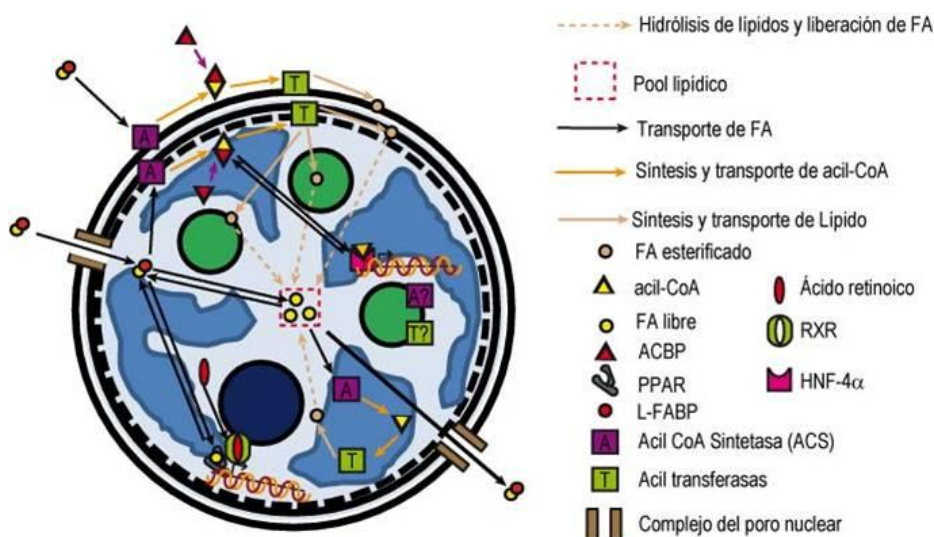


Figura 7. Mecanismo propuesto para el metabolismo nuclear de ácidos grasos.

Las nLD poseen un activo metabolismo lipídico ya que los FA esterificados en los LP y LN de las mismas se remodelan con especificidad respecto de la clase lipídica y el tipo de FA. Sin embargo, debido a limitaciones metodológicas, no es posible precisar aún si las nLD poseen todas las estructuras y componentes requeridos en estos procesos y por lo tanto tendrían autonomía respecto a los demás componentes nucleares. De todas formas, los lípidos provenientes de otras zonas del núcleo se podrían incorporar en las nLD, o las propias nLD se desplazarían por el interior nuclear hasta la zona de síntesis o remodelado de FA con la participación de la actina y miosina nuclear [40].

La función de los TAG nucleares no sería la de proveer energía a la célula como en el caso de los TAG de las cLD, si no que serían fuente de DAG (como segundos mensajeros) y/o FA que actuarían como ligandos/sustratos de factores de transcripción/enzimas.

Está descripto que los DAG y los ácidos fosfatídicos (PA) son importantes segundos mensajeros generados en el núcleo en respuesta a determinados estímulos en el hígado y en el sistema nervioso [41], [42]. Las nLD también podrían aportar LP (fosfatidilinositol (PI), esfingomielina (SM), etc) de la monocapa para las vías de señalización que se desarrollan en la matriz nuclear. Podemos suponer entonces que la fuente de los sustratos lipídicos y de las enzimas involucradas en dichos procesos podría localizarse en las nLD.

La L-FABP promueve la movilización de FA dentro del núcleo, la redistribución mediante el remodelado de FA en las diferentes clases lipídicas, y finalmente la liberación de FA al citosol [18] (Figura 7). El remodelado de los FA de las distintas especies moleculares determinaría la composición final de las mismas, y el transporte reverso de FA sería un mecanismo de exportación de FA desde el núcleo hacia el citosol y hacia otras organelas. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados en hepatocitos en condiciones normales por Petrescu et al., ya que en respuesta a determinados estímulos (ligandos lipídicos), la L-FABP citosólica transloca al núcleo por un tiempo corto y luego regresa al citosol [43].

La L-FABP favorece la movilización de FA proveniente de los distintos pools lipídicos con especificidad respecto al FA; en particular favorece la movilización y posterior esterificación del 20:4n-6 en PI y de 18:1n-9 en CE. Esto implica una acción muy selectiva de la L-FABP respecto al FA y al destino final del mismo.

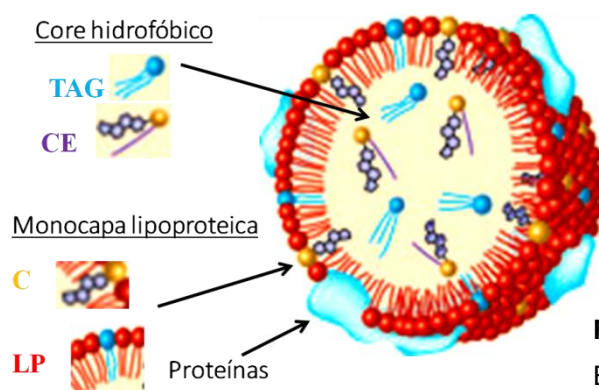
La movilización de FA ya sea exógenos (provenientes del citosol) o nucleares (producto de hidrólisis de lípidos nucleares), puede considerarse como el aporte de FA para el “encendido” de vías de señalización mediante la unión del FA a factores de transcripción específicos. En este sentido se ha propuesto que los FA, en un proceso que implicaría la unión a PPAR (*peroxisomal proliferator activator receptor*) y por formación de heterodímeros con receptores del ácido 9-cis retinoico (RXR) [44], regulan la expresión de genes del metabolismo lipídico. Por otro lado, los fenómenos de esterificación de FA en los lípidos nucleares y/o la movilización de FA fuera del núcleo, serían los procesos de “apagado” de esa misma señal, ya que se eliminan de la circulación nuclear los FA que se desprendieron de esos factores de transcripción.

## 2.7. GÉNESIS Y METABOLISMO DE LAS GOTAS LIPÍDICAS CITOSÓLICAS

### 2.7.1. Estructura y formación de las cLD

Hasta el momento, los datos bibliográficos respecto a la génesis y metabolismo de las gotas lipídicas se restringen a las cLD, y los únicos datos respecto a las nLD son los realizados en el laboratorio.

Las cLD son un organoide celular muy dinámico que se caracteriza por estar constituido por una organización supramolecular de lípidos y proteínas (Figura 8). Son esferas macizas cuya periferia está constituida por una monocapa de LP, C y proteínas asociadas, y el interior de las LD es un core hidrofóbico constituido mayoritariamente por LN.



**Figura 8. Estructura de la cLD.**  
Esquema de una cLD adaptado de [45].

### 2.7.1.1. Composición química de las cLD

#### Monocapa

##### *Lípidos*

La monocapa de las cLD están constituidas por los lípidos: GPL, SL y C.

Entre los GPL presentes en la monocapa, PC es la clase más abundante, seguido por fofatidiletanolamina (PE), PI, éter PC/PE y pequeñas cantidades de liso PC, liso PE, fofatidilserina (PS) y el esfingolípido SM [46]–[49]. El esteroide presente es el C.

La monocapa está estructurada con los grupos hidrofílicos de los LP orientados hacia la superficie exterior de la LD que está en contacto con el medio acuoso citoplasmático, y con las colas hidrofóbicas hidrocarbonadas de los restos acilo dirigidos hacia el core hidrofóbico de las LD. Las moléculas de C se insertan en la monocapa.

Se predice que las cLD se originan en el ER, sin embargo la composición de la monocapa de las cLD posee C, en tanto que la composición de la bicapa de la membrana del ER no posee C [50].

##### *Proteínas*

Se propone que las proteínas de las LD se localizan mayoritariamente en la monocapa lipídica, insertándose en la misma o mediante diferentes tipos de interacciones débiles. Algunas proteínas se unen a las LD a través de péptidos hidrofóbicos que atraviesan la monocapa y llegan hasta el core hidrofóbico.

La composición de las proteínas de las LD es dinámica en respuesta al metabolismo celular y a estímulos externos, ya que las proteínas translocan activamente entre la monocapa y otros dominios celulares [51].

## Core hidrofóbico

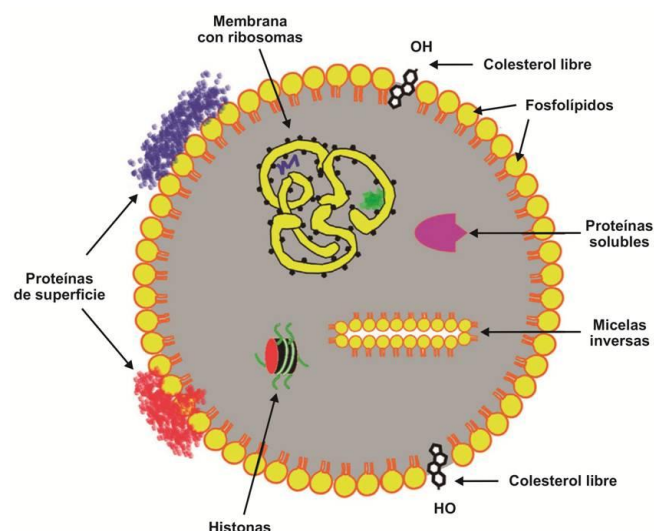
### Lípidos

En el interior de las LD, por debajo de la monocapa lipoproteica, se encuentran los lípidos neutros, constituidos mayoritariamente por TAG, EC, DAG, y una baja cantidad de diacilglicéridos con una unión éter (MADAG), retinil ésteres y C [48], [49].

A la fecha existe abundante información respecto a la composición proteica de las LD en respuesta a estímulos externos, mientras que la información de la composición lipídica es escasa.

### Otros componentes y estructuras

Se ha detectado la presencia de proteínas hidrofílicas en el interior del core de las gotas lipídicas, que puede explicarse mediante el modelo de “brotación vesicular” (Sección 2.7.1.2. *Génesis de las cLD*), donde las cLD formadas en el ER poseen en su interior un dominio hidrofílico (monocapa invertida) que genera un sector acuoso dentro de la “pileta hidrofóbica” (core), donde se encontrarían dichas proteínas [52]. Por su parte, en algunos tipos y condiciones celulares se han observado dentro del core restos de sacos membranosos del tipo del ER (con y sin ribosomas adheridos) (Figura 9).



**Figura 9. Componentes del core de la cLD.** Esquema de una cLD. La monocapa fosfolipídica rodea el core hidrofóbico constituido principalmente por TAG y CE, que también contiene proteínas, RNA, micelas lipídicas, restos de membrana y ribosomas. Adaptado de [52].

## Situaciones no resultas con el modelo actual de las cLD

En las cLD se han descrito numerosas proteínas que se encontrarían en su estado nativo ya que poseen su actividad biológica intrínseca, pero resulta difícil explicar este hecho con el modelo actual de cLD. Por ejemplo, la ACAT es una enzima que ha sido descrita en las cLD. Esta es una proteína de membrana, principalmente presente en el ER, que posee numerosos dominios transmembrana en una bicapa lipídica. Por lo tanto, resulta difícil explicar cómo podría ubicarse en la monocapa de la cLD, ya que esta posee un menor espesor que una bicapa [53]. En el ER, los segmentos transmembrana de la ACAT asoman en las caras hidrofílicas de ambos lados de la bicapa, mientras que la monocapa de las cLD posee un cara hidrofílica y otra hidrofóbica. No se ha propuesto al momento cómo debería ubicarse la ACAT en una monocapa, ya que si el modelo de las cLD es válido, en las cLD la ACAT debería tener una conformación diferente a la que posee en la bicapa.

### 2.7.1.2. Génesis de las cLD

En las células eucariotas, la génesis de las cLD comienza en el RE, donde se sintetizan los lípidos y luego se ensamblan con parte de las proteínas, originando estructuras supramoleculares. No se conoce el mecanismo exacto de formación de las cLD. Se propone que dicho mecanismo se llevaría a cabo en el ER; así mismo, se ha propuesto que bajo determinadas condiciones las cLD también podrían originarse en la membrana plasmática de células eucariotas [50].

Se han propuesto tres mecanismos para la formación de las cLD ([Figura 10](#)) [50].

- 1) En el modelo de “Dominio del ER y brotación” (del inglés *budding model*), se propone que se genera una acumulación de lípidos en un dominio específico del ER con activa síntesis lipídica [50]. Inicialmente, los LN (TAG, EC, etc) sintetizados se acumulan y concentran en el interior de la bicapa del ER. A medida que aumenta la masa de LN esa zona del RE es cubierta por proteínas tales como proteínas de la familia de las perilipinas que favorecen la brotación hacia el citosol, y finalmente determina que la cLD quede rodeada



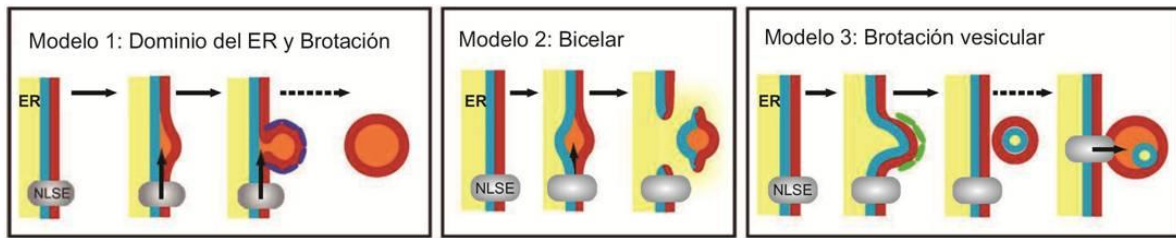
por la hemicapa citosólica de la membrana del RE [45]. Este modelo es en general ampliamente aceptado. A partir de estudios biofísicos en modelos *in vitro*, se ha determinado que una bicapa de PC puede albergar hasta un 3% de TAG en el interior de la misma, ya que a concentraciones mayores, los TAG no se solubilizan en la bicapa y se produce una brotación espontánea que queda rodeada por una de las monocapas [54].

- 2) En el modelo “Bicelar”<sup>1</sup> las LD se forman inicialmente como un disco en forma de lente (del inglés *lens shape*) por la acumulación de LN (TAG, EC, etc) que se localizan y concentran en el interior de la bicapa del ER, y queda rodeado por una monocapa formada por cada una de las caras, citosólica y luminal, de la membrana del RE. Cuando el disco (cuyo interior es el futuro core hidrofóbico de la cLD) adquiere un tamaño adecuado, la cLD se libera por una escisión en la membrana del RE, generando un orificio en la misma por el que saldría el contenido del lumen del RE al citosol.
- 3) En modelo de “Brotación vesicular” inicialmente se genera del ER una vesícula con bicapa y con contenido acuoso del lumen, utilizando la maquinaria de la formación de vesículas de la vía secretoria. Esta vesícula permanece en contacto con el ER en dominios de activa síntesis lipídica y comienza a llenarse de LN que se localizan entre ambas monocapas de la vesícula. Por lo tanto, se forma una cLD que en su interior posee un dominio acuoso rodeado por la monocapa que podría contener proteínas del lumen del ER. Este modelo explicaría la presencia de proteínas hidrofílicas en el interior del core hidrofóbico que han sido observadas por diferentes técnicas de microscopía [55].

---

<sup>1</sup> Las Bicelas (del inglés *bicelle*) son agregados supramoleculares en forma de discos compactos, con GPL de cadena larga que forman una bicapa plana central, donde en el interior están en contacto los extremos de las cadenas hidrocarbonadas de los restos acilo de los GPL de cada monocapa [56]. En los bordes del disco se ubican moléculas anfifílicas (detergentes o lípidos de cadena corta) que rodean y protegen el contorno hidrofóbico de la bicapa del medio acuoso en el que esta solubilizado el disco.





**Figura 10.** Modelos de génesis de cLD. LN (naranja); enzimas de síntesis de LN (NLSE); hemicapa interna del ER (celeste); hemicapa externa del ER (rojo); contenido del ER (amarillo); proteínas que cubren la hemicapa externa en el Modelo 1 (azul); maquinaria de la brotación vesicular en el Modelo 3 (verde). Adaptado de [50].

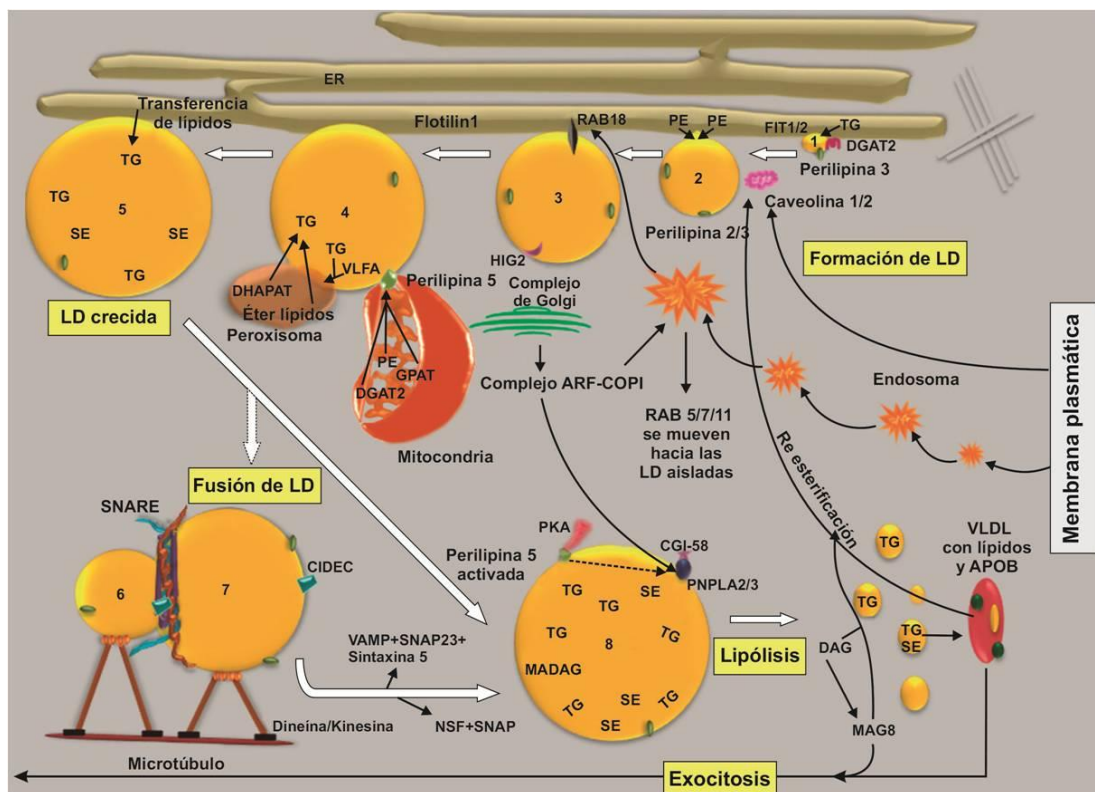
Durante su existencia, las cLD pueden aumentar y/o disminuir de tamaño/número, y modificar su composición lipídica y proteica. El tamaño y número de las cLD depende de la relación que existe entre los procesos anabólicos (lipogénesis) y catabólicos (lipólisis) intrínsecos de la cLD, de la incorporación y/o liberación de moléculas individuales, ya sea de las proteínas y/o lípidos que las componen, y/o de procesos de fusión/fisión en los que participan las cLD [57]–[59]. En el citosol, las cLD interaccionan con mitocondrias y peroxisomas y en ese proceso existe una transferencia de moléculas entre los organoides [60].

El ER es el organoide central para la síntesis de lípidos y proteínas celulares. Se considera que las cLD se originan en el ER y en el proceso participan un gran número de moléculas diferentes, tales como las proteínas *seipin*, lipinas y FIT1y2 [61]–[63]. Durante la biogénesis de las cLD, las proteínas *seipin*, residentes en el ER, se localizan entre el ER y las LD nacientes y así regulan la dinámica de las LD [64], aunque el mecanismo exacto en relación a la formación de las cLD hepáticas permanece desconocido [58].

Adicionalmente, FIT1 y 2 son proteínas transmembrana ubicadas en el ER, estas se unen de una manera específica a los TAG y los direccionan desde el ER a las LD nacientes [65]. Las proteínas FIT no están involucradas en la síntesis de TAG *per se*, pero permiten que el TAG formado se dirija al interior de las LD y así participe en la formación de las cLD [65], [66].

Durante el crecimiento de las cLD por brotación (*budding*) se generan microdominios en el ER donde proteínas como SPFH (*Stomatin Prohibitin Flotillin-HflC/K*), Flotilina1 y *stomatin* forman andamios que actúan en la formación de las LD [67]–[70]. Una vez que el ensamblaje de proteínas comienza, los TAG acumulados

crean una protuberancia en el interior de la bicapa del ER con altas concentraciones de TAG en una hemicapa fosfolipídica. Durante este proceso, se sintetiza una mayor cantidad de PE a través de la vía CDP-etanolamina. La PE, dada su característica de cabeza pequeña, forma estructuras no-bicapa creando una curvatura negativa e incorporando proteínas en el interior de la membrana [67], lo que explica el incremento de los niveles de PE observados durante formación de las cLD [60], [67], [71]. Luego de formadas las LD, se desencadena un proceso que estabiliza su estructura a través de la difusión lateral de TAG en la monocapa y el reclutamiento de proteínas como perilipina3, lipinas, anexinas, Rabs y caveolina2 en la superficie y otras enzimas del metabolismo lipídico presentes en el core de las LD [72], [73]. Si bien caveolina2 interactúa con las cLD, su función exacta es desconocida [73].



**Figura 11. Procesos intracelulares en el crecimiento de las cLD y su lipólisis.** Inicialmente, perilipinas2/3, FIT1/2, DGAT2, Flotilina1 y PE están involucradas en la formación de las cLD. Rab18 y seipin conectan las cLD con el ER. Perilipina5 actúa como un puente entre las cLD las mitocondrias. En esteatosis, CIDEC e HIG2 se localizan en la monocapa de las cLD. La fusión de cLD se produce mediante el complejo SNARE. Durante la lipólisis de las cLD, perilipina5 es fosforilada y facilita la asociación de CGI-58 y PNPLA2/3 que hidrolizan lípidos neutros. Los FA generados pueden ser utilizados por la célula, ser incorporados en otras cLD como parte de un ciclo fútil, o ser re-esterificados en las partículas de VLDL. Adaptado de [60].

Los lípidos son incorporados por difusión lateral en el ER y son transferidos al core de las cLD. Específicamente, ER alberga DGAT1 (*diglyceride acyltransferase-1*) que convierte DAG en TAG. Por su parte, la síntesis de TAG durante la expansión de las cLD es catalizada por DGAT2 que se localiza en la superficie de las cLD [74], [75]. El ER comparte sus lípidos de membrana y proteínas asociadas a lípidos con las cLD y regula su crecimiento (Figura 11). Esto ha sido demostrado por proteínas como FATP1 (*fatty acid transport protein1*), Rab18, DGAT2, Ice2p (*type-III transmembrane protein*), UBXD8 (*UBX-domain-containing proteins*) y ATGL que migran entre el ER y las cLD [74], [76]–[78]. El grado en el que estas proteínas tienen roles similares en el crecimiento de las cLD en hepatocitos es aún desconocido.

## 2.7.2. Proteínas asociadas con la formación y mantenimiento de las cLD

### 2.7.2.1. Perilipinas asociadas a las cLD

Las perilipinas son un grupo de proteínas que se encuentran en la superficie de las cLD y su presencia depende de la fase de crecimiento en la que se encuentran las cLD y de los procesos celulares en los que participan [79]. Todas las perilipinas están asociadas a cLD hepáticas en la enfermedad de hígado graso. La perilipina1 (perilipinaA), posee un importante rol en la regulación de la lipólisis [80]. La perilipina4 (S3-12) está asociada a las LD nacientes, y variaciones genéticas en la proteína están estrechamente asociadas con anomalías relacionadas a la obesidad en humanos [81]. Ambas proteínas también están presentes en adipocitos. La perilipina2 (ADRP – proteína asociada a la diferenciación del tejido adiposo) se expresa de manera ubicua e interacciona con las cLD, protegiéndolas de la acción de lipasas (HSL-lipasa sensible a hormona) [51]. La presencia de perilipina2 en las cLD depende del contenido lipídico en la célula, y cuando disminuye la síntesis de ácidos grasos, esta proteína se degrada vía proteosomal. En hepatocitos, la perilipina2 juega un rol muy importante en el almacenamiento de lípidos, en la biogénesis de cLD, y en el control de la secreción de VLDL [82]. La perilipina 3 (TIP47) se localiza en la superficie de las cLD sería importante en la expansión de las cLD nacientes [48], [79]. En hepatocitos, las perilipinas 2 y 3, son dos de las

principales proteínas involucradas en la regulación de la biogénesis de las cLD y del contenido de TAG. Ambas perilipinas están presentes en cLD pequeñas. La perilipina5 protege a las cLD de la movilización lipídica en hepatocitos, y se encuentra presente en cLD de mayor tamaño.

Durante las distintas etapas del crecimiento de las cLD, existe un activo recambio de las perilipinas de la superficie, cuyo rol es el mantenimiento de la morfología y patofisiología de las cLD. Las perilipinas mantienen el contenido de TAG en las cLD de hepatocitos, son esenciales en el recambio lipídico de las mismas, y por lo tanto juegan un rol importante en las patologías de NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*).

#### **2.7.2.2. Miembros de la familia Rab asociados a las cLD**

Una importante clase de proteínas de la superficie de las cLD son las proteínas Rab GTPasas, siendo las más importantes las proteínas Rab5, 7 y 11 que actúan como coordinadoras del tráfico de endosomas y en el crecimiento de las cLD. Rab18 facilita la asociación entre el retículo endoplásmico (ER) y las cLD, y así el tráfico de lípidos neutros sintetizados en el ER hacia las cLD a través de la monocapa de las mismas ([Figura 11](#)) [83]. En adipocitos y hepatocitos, la perilipina2 y Rab18 se encuentran en la superficie de las cLD favoreciendo la síntesis lipídica dependiente de insulina [83], [84].

#### **2.7.2.3. Otras proteínas asociadas a la monocapa de las cLD**

En esteatosis hepática, en la superficie de las cLD se localizan junto con perilipinas y proteínas Rab, las proteínas CIDEA (*cell death inducing DNA fragmentation factor A like effector C*) e HIG2 (*hypoxia inducible gene 2*). CIDEA se acumula en hepatocitos en respuesta a la sobrecarga lipídica, y se propone que esta proteína puede participar favoreciendo la fusión de las cLD [85]. La sobreexpresión de este gen disminuye la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias de células hepáticas [86]. En condiciones de hipoxia y esteatosis, HIG2 disminuye la eficiencia de la oxidación de ácidos grasos y estimula la acumulación de TAG, particularmente cuando se localiza en la superficie de las cLD en asociación con

perilipinas2 y 3 [87], [88]. Vimentina (VIM), es otra proteína asociada a las cLD. Si bien no se conoce el rol preciso de la vimentina en NAFLD, se propone que la acumulación de lípidos en hepatocitos de ratón induciría la apoptosis mediante un mecanismo en el que participaría VIM.

### 2.7.3. Relación entre cLD, ILD y VLDL

Ha sido demostrado en hepatocitos de rata que la mayor parte de los TAG secretados en VLDL, proviene de la lipólisis y re-esterificación de TAG [89]–[91]. Se ha propuesto que las gotas lipídicas presentes en el lumen del ER (ILD) proveen los TAG necesarios para la síntesis (lipidación) de VLDL, mediante un proceso que involucra la lipólisis de los TAG hepáticos almacenados y su posterior re-esterificación [92]. Las ILD se forman por medio de la proteína de transferencia de triacilglicéridos microsomal (MTP) localizada en el ER [45].

El modelo de ensamblaje de las VLDL hepáticas incluye dos etapas [93]. En una primera etapa, se forma en el lumen del ER un precursor de VLDL pequeña, parcialmente lipidada, conteniendo ApoB. En una segunda instancia, ocurre la transferencia de TAG desde las ILD hacia el precursor, para formar la auténtica VLDL [62]. Se ha propuesto un mecanismo de transferencia de lípidos desde las ILD hacia las pre-VLDL en el que FA, DAG y monoacilglicéridos (MAG) se generan por lipasas presentes en el ER mediante lipólisis de los TAG de las ILD, seguido de la síntesis de TAG en las VLDL.

El proceso de formación de VLDL maduras es controversial. Si bien el mismo puede desarrollarse totalmente en el ER, se propone que alternativamente, las VLDL prematuras migrarían al complejo de Golgi donde se completaría la maduración de las mismas. Durante el transporte al Golgi, las VLDL pueden asociarse con cLD [94], [95], en un proceso que implica la lipólisis de TAG de las cLD y re-esterificación para formar VLDL maduras [96]. Se ha evidenciado que en este proceso participa la proteína DGAT2 [94], [95], la cual está inserta en la hemicapa citosólica del ER, pero que puede migrar entre el ER y la monocapa de las cLD [74], [76], [78]. Por su parte, ha sido demostrado que una fracción de los TAG re-esterificados son incorporados en las cLD en un ciclo fútil [89]–[91].

ApoB podría actuar como una molécula de selección de carga para la incorporación de VLDL en vesículas de transporte, ya que aquellas lipoproteínas que contienen apoB que no se ajustan al control de calidad del ER (apoB mal plegadas en la superficie de la VLDL) sufren degradación intracelular. Aunque la degradación de apoB por la vía proteosomal y de degradación asociada al ER ha sido documentada, el destino de los lípidos asociados con tales partículas conteniendo apoB defectuosas es desconocido. Es posible que hidrolasas lipídicas localizadas en el ER participen en la degradación de estos lípidos [97].

#### 2.7.4. Crecimiento y desplazamiento de las cLD

En el crecimiento y movilidad de las cLD están involucradas diversas moléculas, tales como Rab-GTPasas, perilipinas, y dineínas. La forma más común de crecimiento de cLD es mediante la difusión de lípidos provenientes del ER o del citosol al interior de la LD [96]. Otro mecanismo descrito es la fusión de LD pequeñas para formar una de mayor tamaño [98].

#### 2.7.5. Rol del complejo proteico SNARE en la fusión de cLD

En la actualidad, se desconoce el mecanismo preciso de crecimiento de cLD en hepatocitos. Se postula que el mecanismo de maduración de cLD y su aumento de tamaño se deben a la transferencia de lípidos neutros hacia LD pre-existentes [96], [98]; no obstante, en condiciones patofisiologías o inducidas por drogas, pueden generarse cLD de gran tamaño por fusión de cLD pequeñas, proceso en el que participa el complejo de proteínas SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein-receptor*).

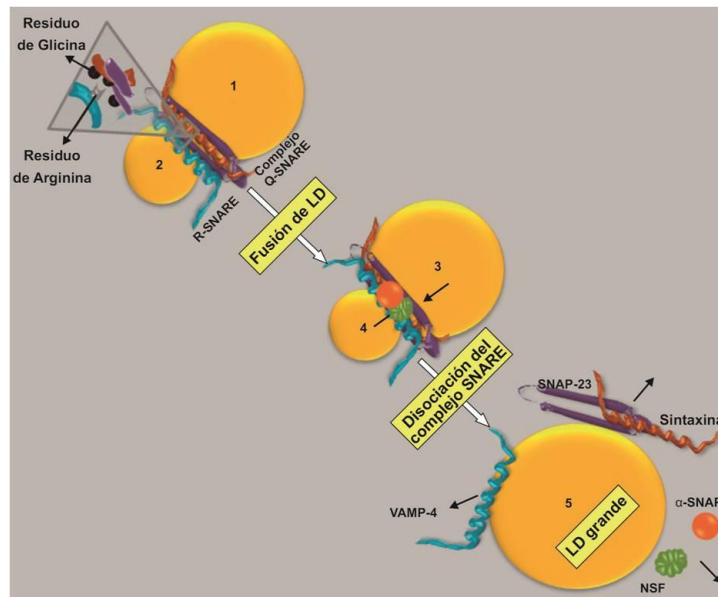
Durante el proceso de fusión, las cLD se asocian con microtúbulos a través de las proteínas motoras dineína y/o kinesinas para permitir que las LD se desplacen en forma flexible por los microtúbulos [48], [50], [67]. La fusión de vesículas que están compuestas de una doble bicapa (fusión homotípica de bicapas) puede ser más compleja que la fusión de LD adyacentes que están rodeadas de una monocapa (fusión homotípica de monocapa). El complejo SNARE involucra syntaxina-5,



SNAP23 (*synaptosomal associated protein of 23 kDa*), NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), una  $\alpha$ SNAP soluble (NSF adaptor protein) y VAMP4 (*vesicular associated protein 4*). Se postula que en la fusión de dos cLD, la cLD *target* se asocia con el complejo R-SNARE, mientras que la otra cLD con el complejo Q-SNARE. En este punto, la monocapa fosfolipídica se altera y ambos complejos, R y Q-SNARE se asocian hidrófobamente. Con la ayuda de la Arginina y la Glicina, el R-SNARE y el Q-SNARE forman el complejo [99] (Figura 12). El complejo Q-SNARE consiste de una syntaxina y SNAP23 (con dos subunidades), mientras que el complejo R-SNARE está formado por VAMP4; la estructura completa forma un complejo estable llamado trans-SNARE [99]. Este complejo estabiliza la monocapa fosfolipídica de cada cLD en ambos lados y los fusiona en una monocapa. El proceso logra un complejo *cis* y se instala en una de las monocapas después de la fusión. Luego,  $\alpha$ SNAP y NSF se asocian con el complejo *cis* donde liberan la maquinaria de fusión SNARE de la monocapa (Figura 12). De manera simultánea, perilipinas 1/2 y Rab GTPasas del citosol son reclutadas en la superficie de las cLD [100], [101].

Estudios en adipocitos demuestran que en el proceso de fusión de cLD existe una transferencia de lípidos desde la cLD de menor tamaño hacia la cLD más grande debido a las diferencias de presión entre las dos cLD. Este proceso se conoce como “permeación” [102].

Por otro lado, diversas moléculas involucradas en la formación de las cLD, en particular SNAP23 que es parte del complejo SNARE, también facilitan la translocación del transportador de glucosa GLUT2 hacia la superficie celular para la incorporación de glucosa en respuesta a insulina. Bajo condiciones de esteatosis la proteína SNAP23 transloca desde la membrana plasmática hacia las cLD [99]. Se propone que la relocalización de SNAP23 en las cLD en respuesta a la sobrecarga de ácidos grasos favorecería la fusión de LD pero agravaría la resistencia a la insulina ya que se vería limitado el transporte de glucosa a la célula [103]. Sin embargo, el evento de fusión de LD mediado por el complejo SNARE y la formación de cLD grandes en condiciones fisiopatológicas se mantiene enigmático y es materia de intensa investigación [104].



**Figura 12. Rol del complejo SNARE en la fusión de las cLD.** Inicialmente, R-SNARE y Q-SNARE se asocian para formar un complejo, y se produce la fusión. Luego de la fisión de las monocapas, NSF y  $\alpha$ SNAP se unen y el complejo se disocia. Adaptado de [60].

### 2.7.6. Lipólisis de las cLD

Durante un gasto energético continuo en condiciones normales y patofisiológicas, se desencadenan señales sobre las necesidades energéticas celulares vía señalización de catecolaminas a través de hormonas, señales inflamatorias o moléculas nutricionales y otros factores proteicos de las cLD. Como resultado, los receptores proteicos G (como los receptores  $\beta$ -adregénicos) se activan para eventualmente estimular a la proteína kinasa A (PKA) y activar moléculas por mecanismos de fosforilación [45], [48]. Los eventos intracelulares que involucran la formación, crecimiento y lipólisis de LD se representan en la [Figura 11](#).

La lipólisis en hepatocitos es un proceso ligeramente diferente al de adipocitos.

Los ácidos grasos no esterificados liberados por los adipocitos son transportados hacia los hepatocitos, para ser  $\beta$ -oxidados. Las cantidades excesivas de FA recibidas junto con el glicerol de los TAG pueden ser almacenadas de manera temporaria en las cLD para eventualmente ser hidrolizadas y exportadas como partículas de VLDL. La perilipina5 actúa como un puente entre las cLD y la mitocondria, y su asociación previene la acción de la ATGL (*adipose triglyceride*



*lipase*) en las cLD de hepatocitos ([Figura 11](#)). En respuesta a necesidades energéticas, la perilipina5 es fosforilada por la acción de la PKA y capta a la ATGL para co-localizar con CGI-58 en las cLD y así hidrolizar TAG [48].

PNPLA2 y PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein), son hidrolasas de lípidos y se expresan abundantemente en hígado. Se prevé que desempeñan un papel similar a la ATGL, ambas son estructuralmente muy similares [48], [105], [106].

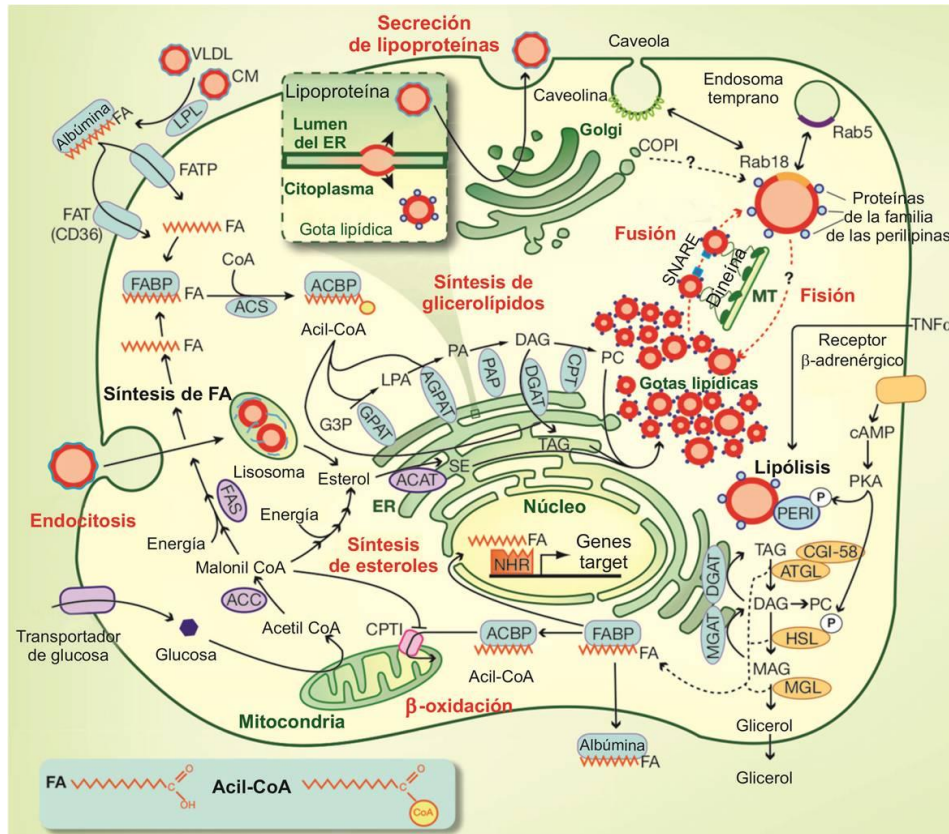
Durante la lipólisis los FA podrían regresar hacia otros procesos celulares para formar TAG o podrían convertirse en fuentes de energía más simples para ser utilizadas por el organismo.

Las cLD, pueden ser degradadas totalmente mediante el proceso de autofagia, en el que las cLD y otras organelas (mitocondrias, vesículas) son englobadas en un autofagosoma, que posteriormente se fusiona con un lisosoma para formar un autolisosoma [107]. Estas organelas son degradadas por la acción de hidrolasas ácidas del lisosoma, incluyendo la lipasa ácida lisosomal (LAL) [108]. Este proceso de degradación de cLD es también conocido con el nombre de “lipofagia”.

De esta manera, podríamos proponer un “ciclo de las cLD”, que comienza con su formación en el RE y terminaría con su degradación por lipofagia.

#### **2.7.7. Rol de las cLD en el metabolismo celular y su asociación con otros organoides**

Las cLD interactúan con otros organoides participando en funciones celulares muy importantes, más allá del metabolismo lipídico. Como se muestra en la [Figura 13](#), las cLD interactúan con ER, Golgi, la membrana plasmática, endosomas, mitocondrias, peroxisomas, VLDL y exosomas [109], [110]. Algunas de estas interacciones podrían estar mediadas por RabGTPasas presentes en las cLD [111].



**Figura 13. Interacciones de las cLD con los diferentes componentes celulares.** En el esquema se grafican los procesos celulares en los que participan las cLD. Adaptado de [45].

### 3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

## OBJETIVOS GENERALES

El objetivo de este proyecto es dilucidar el metabolismo y las funciones biológicas de los lípidos nucleares. Determinar la proteómica y la topología de los dominios lipídicos nucleares.

La información generada en este proyecto de investigación básica, permitirá un mejor diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de patologías donde la homeostasis lipídica está alterada. Entender el metabolismo de los lípidos neutros nucleares permitirá establecer si éstos se relacionan y/o regulan como los citosólicos en condiciones normales y patológicas, e incorporarlos como blancos alternativos en los tratamientos de obesidad, diabetes, dislipemias y aterosclerosis.

### Objetivos específicos

- 1- Determinar la topología, composición química, metabolismo y función de los dominios lipídicos nucleares.
- 2- Dilucidar la génesis y el metabolismo de las gotas lipídicas nucleares (nLD).
- 3- Seleccionar una proteína como marcadora de las nLD que permita identificarlas.
- 4- Determinar si existen proteínas del metabolismo lipídico en alguno de los dominios nucleares.

## HIPÓTESIS

- 1) *Las nLD constituyen un nuevo dominio nuclear metabólicamente activo, donde se concentran los LN (C, CE y TAG) en un core hidrofóbico rodeados por una monocapa lipoproteica.*
- 2) *Las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico, que mediante mecanismos de fusión y de fisión de LD responden a estímulos externos.*
- 3) *Las nLD poseen un metabolismo y regulación diferentes a las cLD.*

- 4) *Las proteínas de la monocapa de las nLD están involucradas en el metabolismo lipídico y en los sistemas de transducción de señales nucleares. Ya sea como componentes estructurales, enzimas, factores de transcripción y / o proteínas de transporte.*

# Capítulo I

## *Dinámica de las nLD*

## Objetivos

- 1- Determinar la topología, composición química y función de las gotas lipídicas nucleares.
- 2- Dilucidar la génesis y el metabolismo de las nLD.

## Hipótesis

- 1) Las gotas lipídicas nucleares constituyen un nuevo dominio nuclear metabólicamente activo, donde se concentran los LN (C, CE y TAG) en un core hidrofóbico rodeados por una monocapa lipoproteica.*
- 2) Las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico, que mediante mecanismos de fusión y de fisión de LD responden a estímulos externos.*
- 3) Las nLD poseen un metabolismo y regulación diferentes a los de las cLD.

#### 4.1. CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA

Esta Tesis se elaboró a partir de un modelo experimental hepático, teniendo en cuenta el rol central del hígado en el metabolismo lipídico. Para abordar los objetivos de este capítulo se eligió el cultivo primario de hepatocitos de rata como un modelo experimental adecuado para evaluar ambos tipos de LD (nLD y cLD) en una misma célula. Así mismo, se utilizó el cultivo de células HepG2 con el propósito de emplear una línea celular ya establecida. Se elaboró la siguiente hipótesis:

*El cultivo primario de hepatocitos de rata y las células HepG2 constituyen un modelo experimental idóneo para caracterizar a las nLD*

##### 4.1.1. Aislamiento de hepatocitos de rata

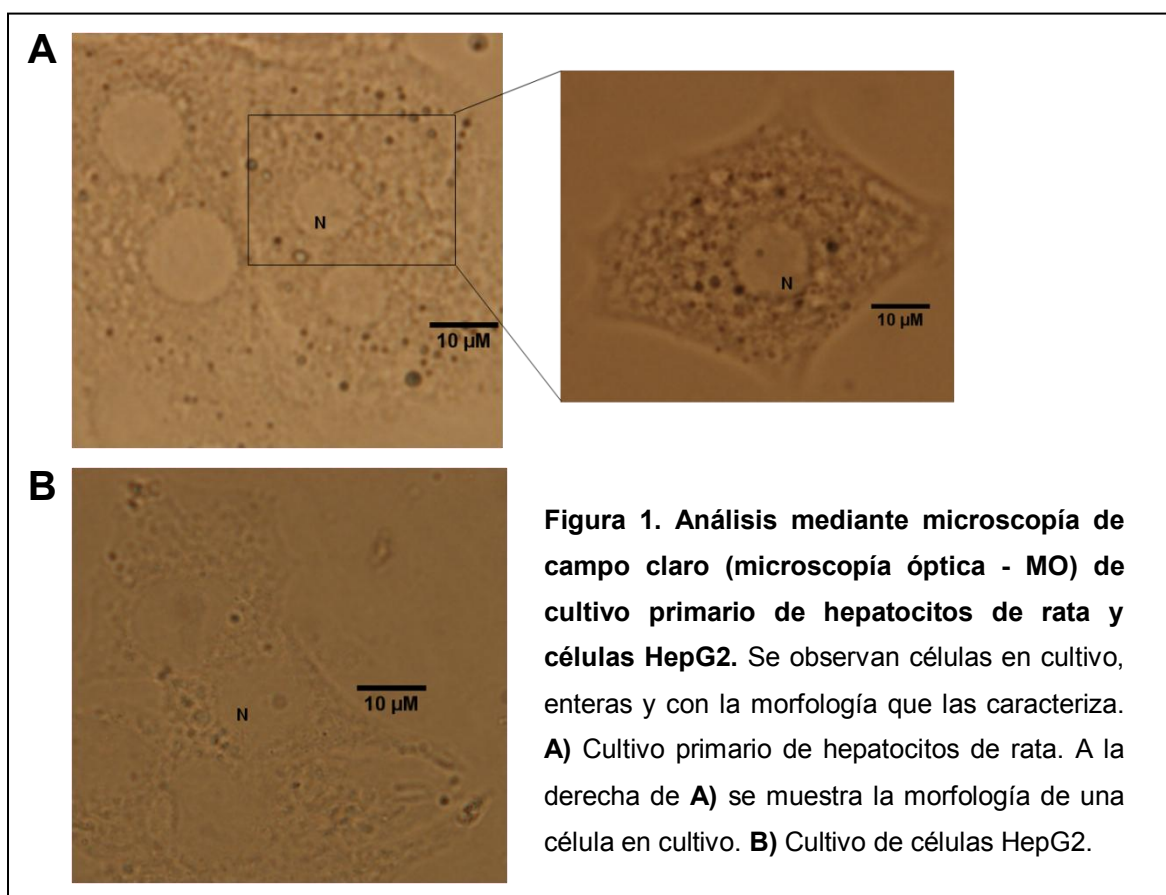
Se puso a punto un protocolo experimental para aislar hepatocitos de rata y luego cultivados a partir del método de Seglen [112] con ligeras modificaciones. El procedimiento consistió básicamente en la perfusión y digestión enzimática del hígado *in situ* [113], seguida de la extracción del órgano del cuerpo del animal y finalmente, mediante procedimientos mecánicos, la desorganización total del tejido, y la liberación de las células al medio. Las células obtenidas se centrifugaron y lavaron repetidas veces, de manera de eliminar células de Kupffer, endoteliales, fibroblastos, eritrocitos y hepatocitos no viables presentes en el sobrenadante, y enriquecer el sedimento en hepatocitos viables [114].

La viabilidad celular se determinó mediante el recuento en cámara de Neubauer y la morfología e integridad celular mediante microscopía de campo claro. En todos los experimentos realizados se observó que las células viables representaban el 70-80% del total celular.

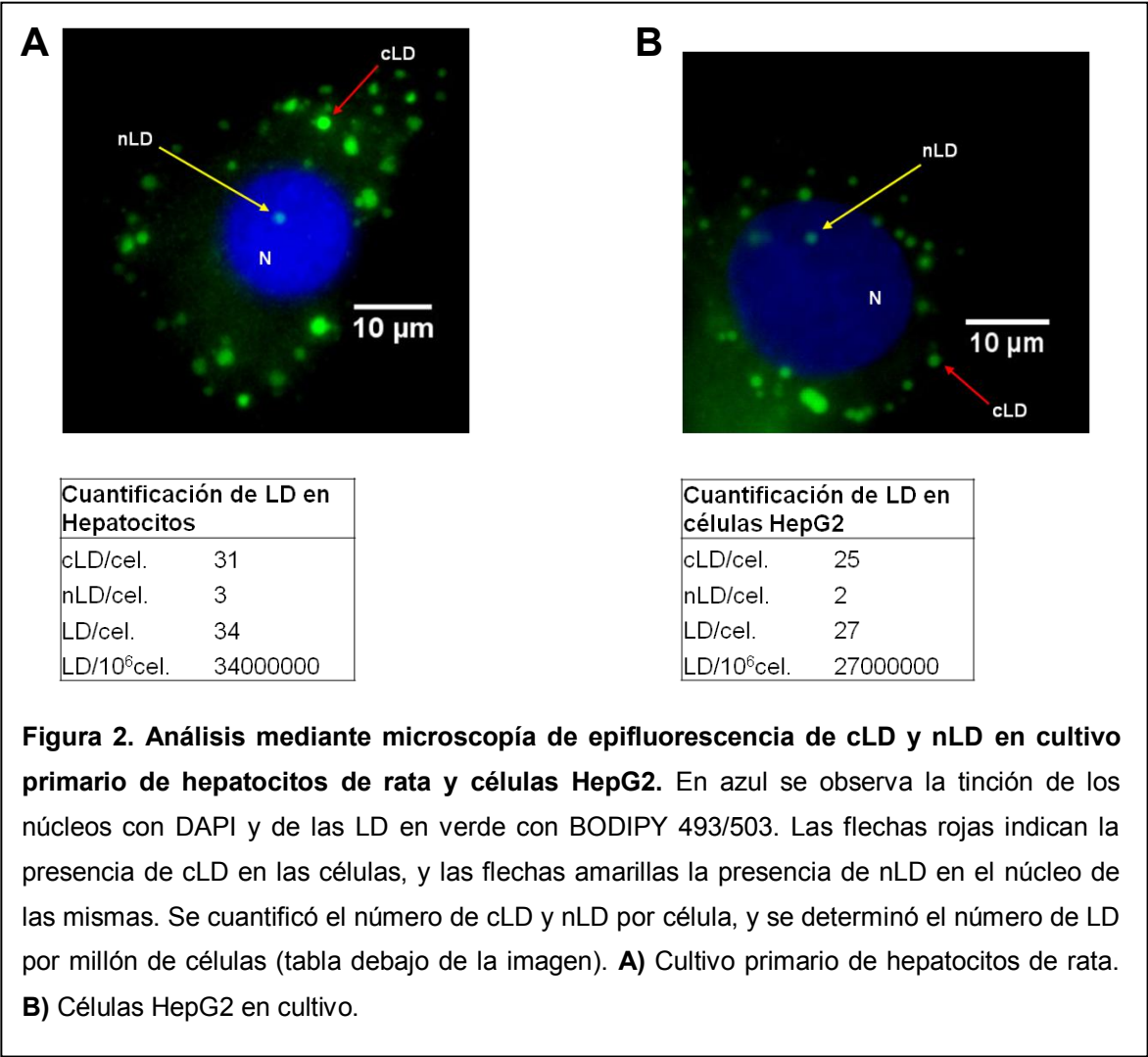


#### 4.1.2. Cultivo de los hepatocitos aislados

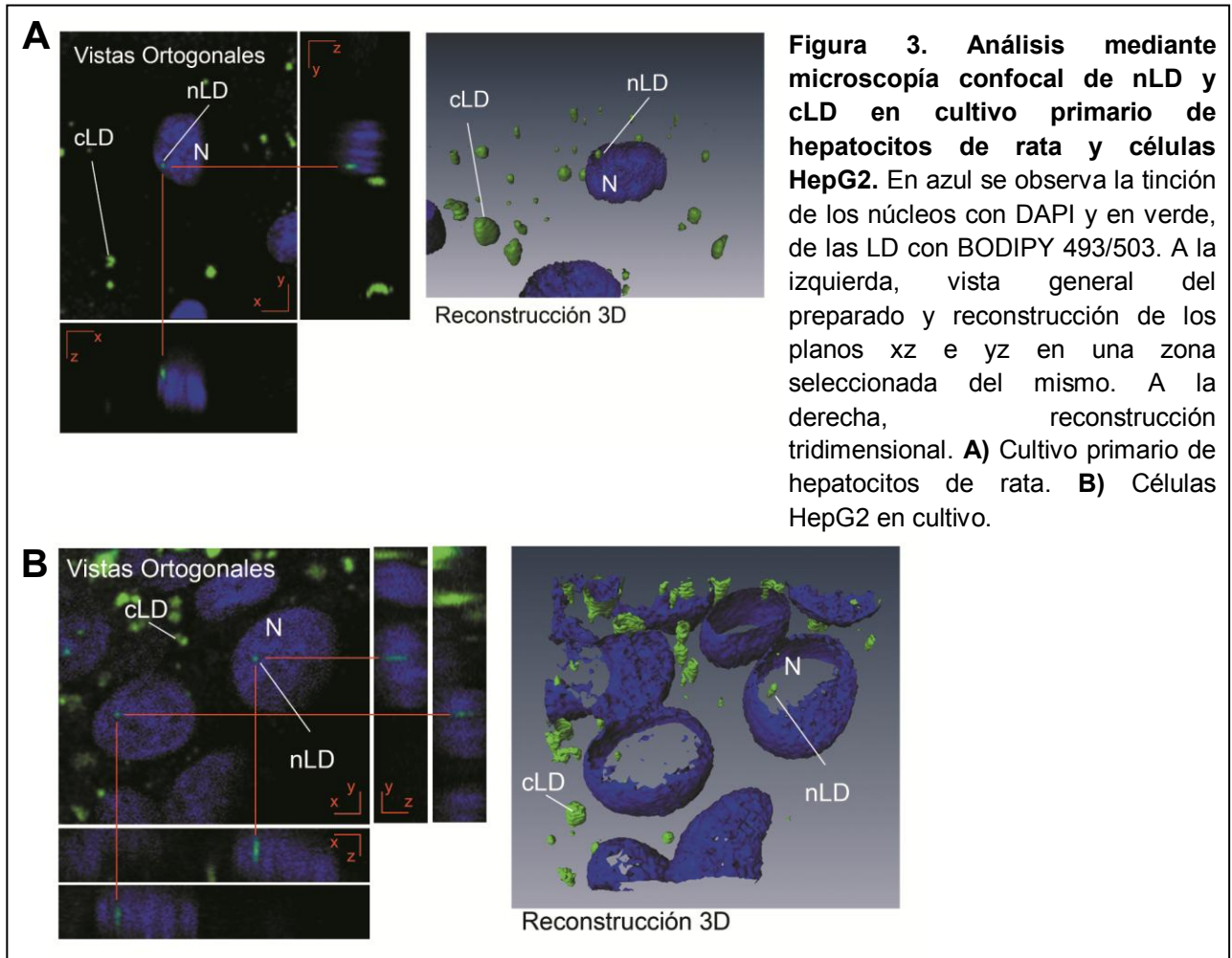
Los hepatocitos aislados se cultivaron, y se obtuvieron imágenes de los mismos mediante distintos tipos de microscopía. Los mismos análisis se realizaron en un cultivo de células HepG2. En una primera etapa las muestras se analizaron mediante microscopía de campo claro (MO) (Figura 1), y posteriormente por microscopía de epifluorescencia (Figura 2) y fluorescencia confocal (Figura 3), para lo cual los núcleos se tiñeron con DAPI y las gotas lipídicas con BODIPY 493/503.



En la Figura 1 podemos ver las células en cultivo enteras y con su morfología distintiva. Se observan hepatocitos con la forma poliédrica característica y células HepG2 con una morfología epitelial propia. Como puede apreciarse en la Figura 2 tanto en hepatocitos como en células HepG2 se observaron gotas lipídicas en el citosol (cLD) y en el núcleo (nLD). La ubicación nuclear de las nLD se confirmó por microscopía confocal (Figura 3) donde pudo observarse que las nLD son pocas y poseen una distribución al azar dentro del núcleo.



Los cultivos primarios de hepatocitos permanecieron viables durante 6 días, a partir del séptimo día se observó que las células comenzaron a perder su forma poliédrica característica, adoptando una morfología más redondeada, con una pérdida simultánea de uniones entre células. A medida que se incrementaron las horas de cultivo, los daños en las células fueron más severos, se observaron citoplasmas contraídos y en algunos casos granulados, los núcleos se vieron pigmentados como respuesta a una posible condensación nuclear, y hubo una pérdida total de uniones entre células, incluso en algunos casos se observaron restos celulares dispersos. Por lo tanto, teniendo en cuenta que los hepatocitos aislados mediante el protocolo detallado permanecen viables y con todas sus características morfológicas durante un tiempo limitado, en los experimentos realizados con dichas células, estas se mantuvieron en cultivo hasta un máximo de 6 días para garantizar las características celulares.



### Conclusión (4.1.)

Mediante la optimización de la técnica de Seglen se obtuvo un cultivo primario de hepatocitos de rata que conserva las características morfológicas de las células durante al menos 6 días de cultivo. Por lo tanto, el cultivo primario de hepatocitos de rata, al igual que el cultivo de células HepG2, constituye un modelo experimental adecuado para evaluar los parámetros bioquímicos y fisiológicos de las nLD y cLD.

#### 4.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS LD EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA Y CÉLULAS HEPG2

Las poblaciones celulares de LD (cLD y nLD) se definieron mediante parámetros morfológicos que se cuantificaron a partir de imágenes de microscopía de epifluorescencia de cultivos de hepatocitos y células HepG2, utilizando el software Image-Pro plus. Se analizaron diferentes campos (imágenes microscópicas) con un número variable de células en cada uno.

Con este fin se midió manualmente el diámetro ( $\mu\text{m}$ ) de cada una de las LD localizadas en el citoplasma (cLD) y dentro del N (nLD) y se contó el número total de las mismas. Se evaluó la normalidad de los datos (diámetros medidos) mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, y se encontró que los mismos no siguen una distribución normal, lo que determinó que se utilizaran test no paramétricos para realizar los correspondientes análisis estadísticos. Se calculó el volumen total de cLD y nLD por célula multiplicando el volumen de una LD ideal (cuyo diámetro es el de la mediana de la población y el volumen el de una esfera) por el número (media) de gotas de la misma. Se identificó el diámetro máximo (Max) de cada población. El diámetro mínimo de las mismas no se evaluó ya que está dado por el límite de resolución del microscopio que se utilizó y por lo tanto es siempre el mismo en todas las poblaciones. Los valores de diámetros medidos para cLD y nLD en cada condición se representaron mediante gráficos de cajas, donde se visualizan los valores mínimo y máximo, y los tres cuartiles de los datos. Los cuartiles son los tres valores de la variable que dividen a un conjunto de datos ordenados en cuatro partes iguales. Q1, Q2 y Q3 determinan los valores correspondientes al 25%, al 50% y al 75% de los datos. Q2 coincide con la mediana.

La distribución de los tamaños (diámetros medidos) de cada población de LD se evaluó definiendo tres categorías según los valores de los cuartiles de los datos Q1 (0,51  $\mu\text{m}$ ) y Q3 (0,77  $\mu\text{m}$ ):  $\leq 0,51$  pequeñas (S), entre 0,51 y 0,77 medianas (M) y mayores a 0,77 grandes (L).

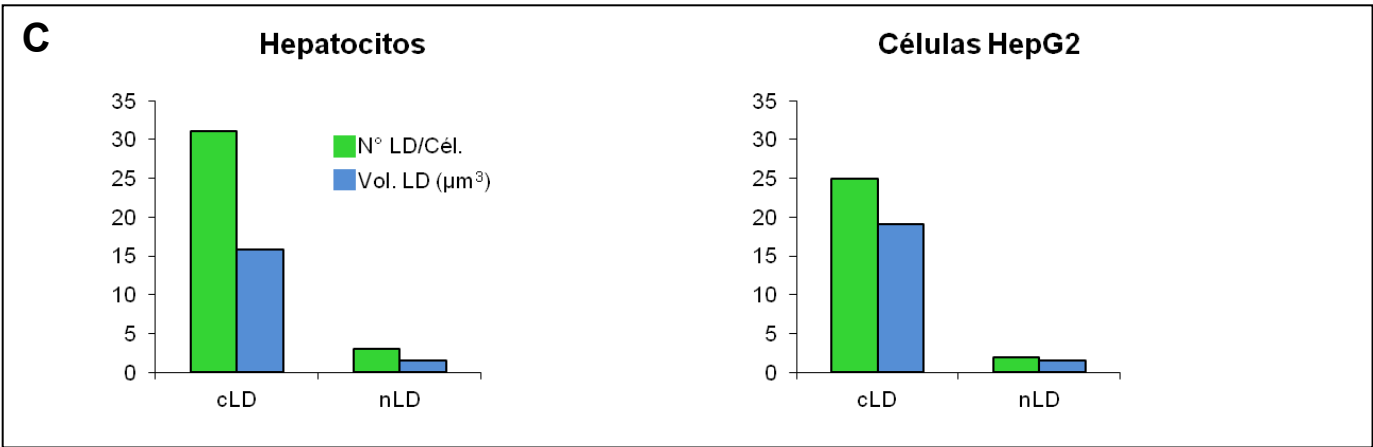
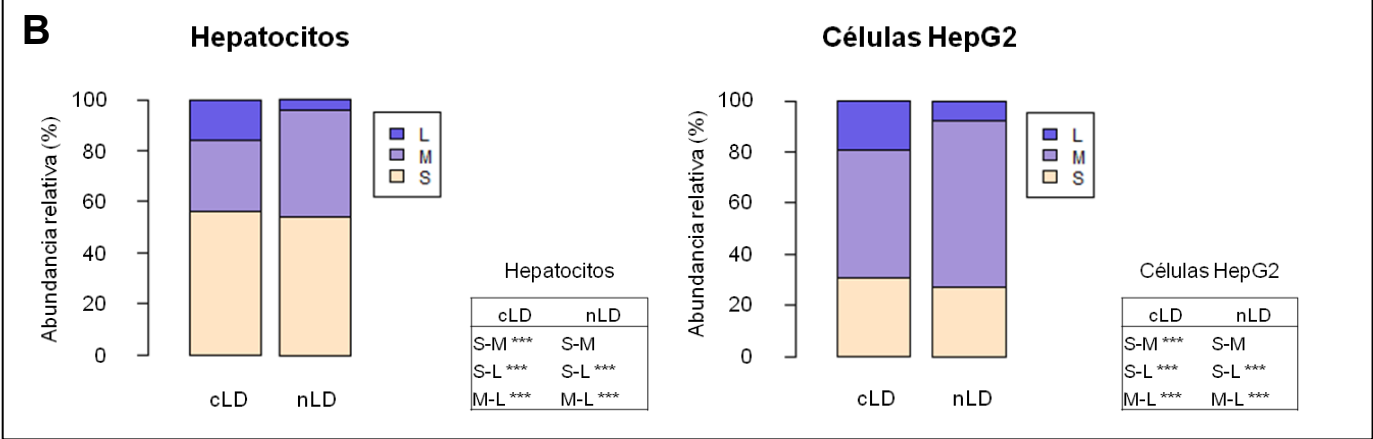
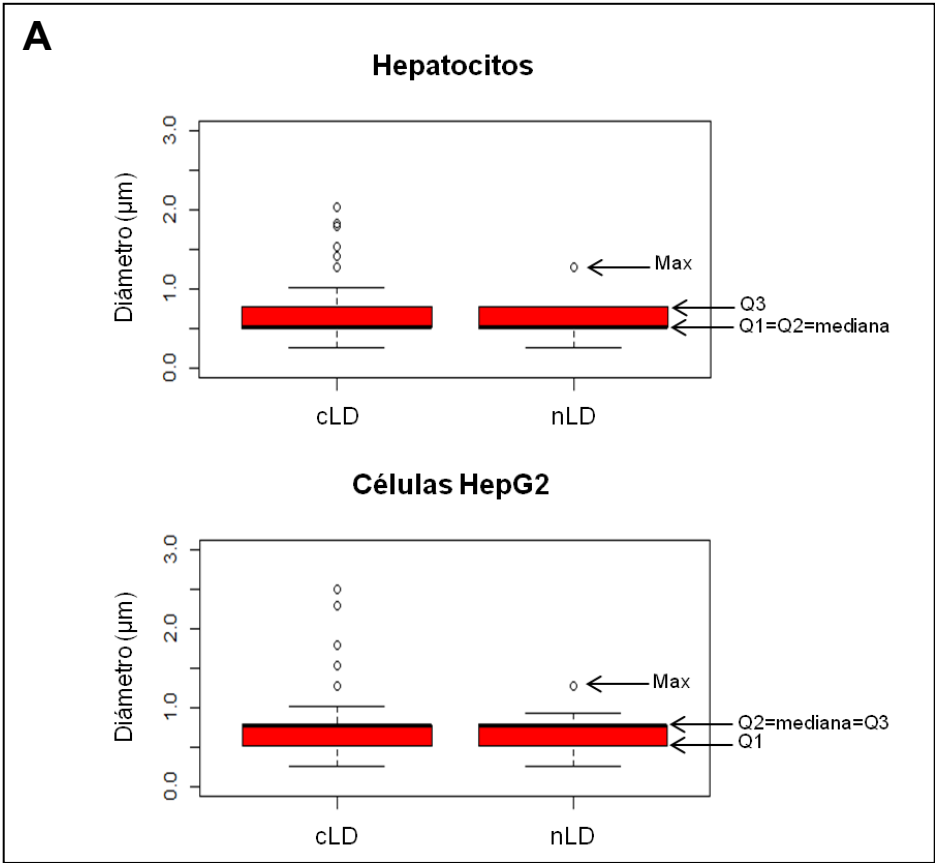
### **Hepatocitos**

Los hepatocitos en condiciones control de cultivo (DMEM suplementado con 10% de FBS), poseen en el citoplasma en promedio 31 cLD y en el N 3 nLD, siendo la mediana del diámetro de ambos tipos de LD 0,51  $\mu\text{m}$  (Figura 4A). En ambos compartimentos la mayoría de las LD son pequeñas (cLD S:57%>M:27%>L:16%; nLD S:54%~M:42%>L:4%) (Figura 4B). La cLD de mayor tamaño posee un diámetro de 2  $\mu\text{m}$  (Max). Por su parte, la nLD de mayor tamaño posee un diámetro de 1,3  $\mu\text{m}$  (Max). Debido al mayor número de las cLD respecto a las nLD, el volumen total que poseen todas las cLD en una célula (15,8  $\mu\text{m}^3$ ) es mucho mayor (10,3 veces) que el de las nLD (1,53  $\mu\text{m}^3$ ) (Figura 4C).

Los resultados obtenidos en el modelo de cultivo primario, son comparables a los obtenidos en el laboratorio previamente a partir de preparados de squash de hígado de rata, y en fracciones nucleares y subnucleares [18], ya que en los mismos se había descrito que el tamaño de las poblaciones de cLD y de nLD presentaban siempre una distribución con sesgo positivo, que se debe a una mayor proporción de LD por debajo del valor de la media (LD pequeñas).

### **Células HepG2**

Las células HepG2 en condiciones control de cultivo (MEM suplementado con 10% FBS) poseen en el citoplasma 25 cLD y en el N 2 nLD, siendo la mediana del diámetro de ambos tipos de LD 0,77  $\mu\text{m}$  (Figura 4A). En ambos compartimentos la mayoría de las LD son medianas (cLD M:50%>S:31%>L:19%; nLD M:65%>S:27%~L:8%) (Figura 4B). Sin embargo en el citosol las cLD poseen en su población LD más grandes que las nLD ya que los diámetros Max son 2,5 y 1,3  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Debido al mayor número de las cLD respecto a las nLD, el volumen total que poseen las cLD (19,1  $\mu\text{m}^3$ ) es mucho mayor (12,5 veces) que el de las nLD (1,53  $\mu\text{m}^3$ ) (Figura 4C).



**Figura 4. Análisis de los parámetros morfológicos de cLD y nLD en cultivo primario de hepatocitos de rata y células HepG2.** A partir de imágenes de microscopía de epifluorescencia equivalentes a la **Figura 2** se midieron los diámetros ( $\mu\text{m}$ ) de cLD y nLD por célula.

**A) Tamaños (diámetros) de cLD y nLD.** En los gráficos de caja (*“box plots”*) se presentan los valores de los cuartiles de los datos, Q1, Q2 y Q3. Q2 se corresponde con el valor de la mediana. El máximo corresponde al mayor valor de diámetro medido presente en la totalidad de las cLD y nLD analizadas.

**B) Distribución de tamaños de cLD y nLD.** La distribución de los tamaños de la población de LD se evaluó en base al diámetro ( $\mu\text{m}$ ) dividiendo a las poblaciones de cLD y nLD en tres categorías, definiendo como punto de corte los valores de los cuartiles Q1 ( $0,51 \mu\text{m}$ ) y Q3 ( $0,77 \mu\text{m}$ ) de los datos, S (*“small”*):  $\leq 0,51$ ; M (*“medium”*):  $> 0,51$  y  $\leq 0,77$ ; L (*“large”*):  $> 0,77$ . Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de proporciones con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Tablas). Se compararon las tres categorías entre sí (S, M y L): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**C) Cuantificación del número y volumen total de cLD y nLD por célula.** El volumen total ( $\mu\text{m}^3$ ) de cLD y nLD por célula se calculó multiplicando el volumen de una LD ideal (cuyo diámetro es el de la mediana de la población y el volumen el de una esfera) por el número de gotas (media) por célula.

## Conclusión (4.2.)

Existe una coordinación entre el metabolismo de las nLD y las cLD que determina que la mayoría de las LD tengan tamaños similares ( $nLD_{\text{mediana}} = cLD_{\text{mediana}}$ ).

La distribución de tamaños de LD (nLD y cLD) tienen características específicas dependiendo del tipo celular, en particular, en los hepatocitos la mayoría de las LD son S mientras que en las células HepG2 son M.

El diámetro máximo (Max) es una característica distintiva de cada tipo de LD (nLD y cLD) en ambos tipos celulares.

Las nLD de ambos tipos celulares corresponden (volumen total) a una muy baja proporción (7-9%) del total celular (nLD+cLD).

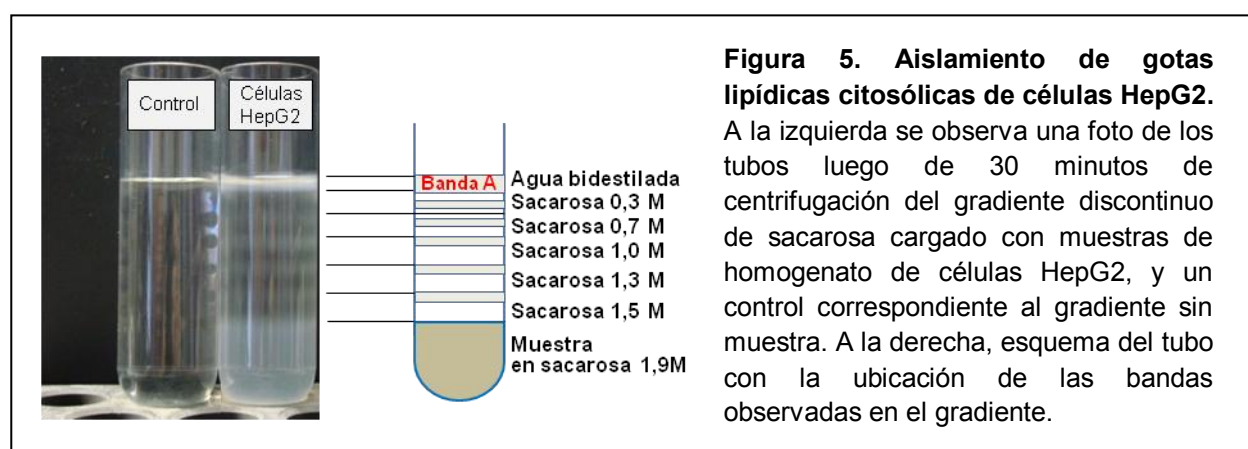


### 4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS GOTAS LIPÍDICAS CITOSÓLICAS DE CÉLULAS HEPG2

#### 4.3.1. Aislamiento de cLD

Se obtuvieron cLD de células HepG2 cultivadas en condición control utilizando un protocolo adaptado a partir del ya descrito para el aislamiento de cLD de hígado de rata, desarrollado previamente en el laboratorio [18].

El procedimiento consta de una homogenización por sonicación de las células HepG2 que permite un mayor rendimiento en LD, seguido de la separación por centrifugación en gradiente de sacarosa basada en diferencias de flotación de las diferentes poblaciones de LD. Como se observa en la [Figura 5](#), la muestra de homogenato de células HepG2 se separó en 6 bandas de diferente densidad que poseen una composición característica tanto lipídica como proteica [115]; estas bandas además poseen diferencias macroscópicas apreciables, entre ellas particulado y coloración (grisácea, blanca). En la parte superior del tubo se observó una banda blanca mayoritaria (banda A) que corresponde a las cLD de mayor tamaño, ricas en TAG y EC. Estos resultados se corresponden con lo observado al aislar cLD de homogenato de hígado de rata [18]. Para aislar nLD primeramente se deberían haber aislado los núcleos de las células en cultivo, y luego a las nLD de dichos núcleos. Dado a que los rendimientos finales del proceso serían demasiado bajos, no es posible en la actualidad realizar dicho procedimiento.





#### 4.3.2. Composición lipídica y contenido proteico de las cLD

Para determinar la composición lipídica de las cLD, los lípidos de la banda A se extrajeron y separaron por cromatografía en capa delgada (TLC) junto con estándares de lípidos.

La [Tabla 1](#) muestra el perfil lipídico y contenido proteico de cLD de células HepG2. En la muestra analizada se encontraron TAG, C y CE, y una baja proporción de FA y de LP (GPL y SL).

**Tabla 1. Composición de gotas lipídicas citosólicas de células HepG2.**

Composición	cLD					
	$\mu\text{g}/10^6\text{cel}$	%	%Total	$\text{nmol}/10^6\text{cel}$	%	$\text{fmol}/\text{LD}$
<b>Proteínas</b>	6,7 $\pm$ 1,1		22,2			
<b>Lípidos</b>	23,6 $\pm$ 0,3		77,8			
<b>Lípidos Polares</b>						
GP + SP	0,1 $\pm$ 0,02	0,5	0,4	0,2 $\pm$ 0,03	0,5	0,006
<b>Lípidos Neutros</b>	23,4	99,5	77,4	27,9	99,5	
TAG	22,0 $\pm$ 0,29	93,3	72,6	25,4 $\pm$ 0,34	90,5	0,942
C	0,2 $\pm$ 0,02	1,0	0,8	0,6 $\pm$ 0,06	2,1	0,022
CE	1,2 $\pm$ 0,03	5,2	4,1	1,9 $\pm$ 0,04	6,8	0,071

En los cálculos solo se consideraron lípidos y proteínas. Los resultados representan la media de al menos 3 experimentos  $\pm$  DS. Se utilizaron los siguientes pesos moleculares: LP: 796; TAG: 864; C: 387; CE: 641. GP: glicerofosfolípidos; SP: esfingolípidos; TAG: triacilglicéridos; C: colesterol; CE: ésteres de colesterol. Lípidos= Lípidos polares + Lípidos neutros.

La composición química de las cLD (banda A) de células HepG2 (expresadas como  $\mu\text{g}/10^6$  células) fue comparable a la de las cLD de hígado de rata (expresada como  $\mu\text{g}/\text{g}$  de hígado) [18], ya que también están compuestas por un 78% de lípidos y 22% de proteínas. Los lípidos de las cLD están constituidos mayoritariamente por LN (99,5%), representando los LP el 0,5% restante. Los LP se cuantificaron por su contenido en fósforo, y no fue posible separar las subclases de LP debido al bajo contenido de las mismas. Las cLD poseen una composición de LN rica en TAG (93,3%), con bajas cantidades de CE (5,2%) y C (1%). Estos datos están en concordancia con lo observado previamente en las cLD de hígado de rata [18], que

también están constituidas mayoritariamente por TAG (92%), con bajas cantidades de CE (5%) y C (2%).

#### 4.3.3. Organización estructural de las cLD

Considerando que las cLD están organizadas en un core hidrofóbico de TAG y CE rodeado por una monocapa de LP, C y proteínas asociadas [18], a partir de los datos de la [Tabla 1](#) calculamos la proporción de componentes de la monocapa y del core hidrofóbico ([Tabla 2](#)), y observamos que la misma fue comparable a la de las cLD de hígado de rata [18]. Los constituyentes de la monocapa de las cLD de células HepG2 (95% proteínas, 3,3% C y 1,7% LP) representan el 23% del total de los componentes de la gota, y el core hidrofóbico, el 77% restante (94,7% TAG y 5,3% CE).

**Tabla 2. Componentes de la monocapa y core de las cLD**

	Células HepG2		HH
	$\mu\text{g}/10^6\text{cel}$	%	%
<b>Monocapa</b>		<b>23</b>	<b>24</b>
Proteínas	6,7	95	91
LP	0,1	2	2
C	0,2	3	7
<b>Core</b>		<b>77</b>	<b>76</b>
TAG	22,0	95	94
EC	1,2	5	6

Los datos correspondientes a células HepG2 se calcularon a partir de los resultados de la [Tabla 1](#) expresados como  $\mu\text{g} \cdot 10^6 \text{ células}^{-1}$ . Se consideró que la monocapa está compuesta por proteínas, lípidos polares y C, y el core por TAG y EC. En el caso de HH (homogenato de hígado de rata) los porcentajes se calcularon a partir de datos expresados como  $\mu\text{g} \cdot \text{g hígado}^{-1}$  [18].

En la [Tabla 1](#) se presentan el número de moles de las distintas clases lipídicas que existen en una cLD (expresados como fmol/LD), los cuales se calcularon a partir de los datos de composición química (nmol/célula) y el número de LD (n°LD/célula).

En la monocapa, asumiendo que todo el C se localiza en la misma, se alojan 4 moléculas de C por cada molécula de LP. En el core hidrofóbico de las cLD, se ubican 13 TAG por cada molécula de CE.

Según nuestro conocimiento, estos son los primeros datos experimentales a partir de los cuales se propone una estequiometría para la monocapa y el core de las cLD de células HepG2. En estos cálculos, no se tuvo en cuenta a las proteínas ya que por el momento resulta imposible determinar los moles de las mismas en la monocapa de las cLD.

No fue posible realizar la composición química de las cLD en cultivo primario de hepatocitos debido a que las determinaciones realizadas no poseen la sensibilidad adecuada para la cantidad de muestra disponible a partir del cultivo primario.

### **Conclusión (4.3.)**

La composición y organización supramolecular de las cLD de células HepG2 es comparable a las cLD aisladas de hígado de rata.

### **4.4. EFECTO DEL ÁCIDO OLEICO Y TRIACSLIN C EN PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DE LD EN HEPATOCITOS DE RATA Y CÉLULAS HEPG2**

Teniendo en cuenta que las cLD son organoides citosólicos dinámicos, el siguiente objetivo fue determinar si las nLD también constituyen un dominio dinámico presente en el núcleo que responde a estímulos externos al igual que las cLD. Se eligió al ácido oleico como estímulo externo en base a antecedentes bibliográficos que demuestran que el AO induce la génesis y el aumento de tamaño de las cLD [29], [116].

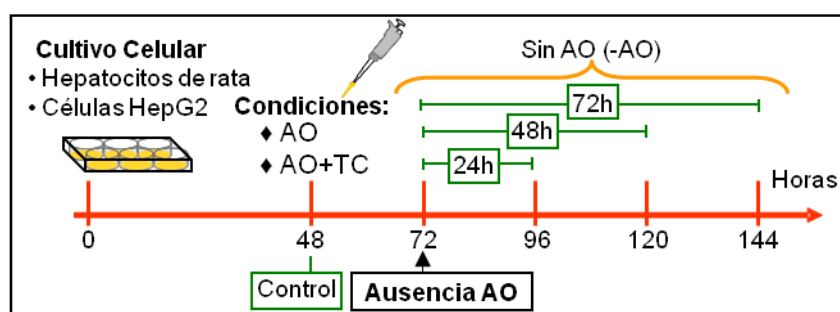
#### 4.4.1. Efecto del Ácido Oleico

Hipótesis:

*El AO determina un aumento en el número y tamaño de las cLD y nLD*

#### Células HepG2

En una primera etapa, para optimizar los protocolos experimentales, se utilizó el cultivo de células HepG2 como se detalla en la [Figura 6](#).

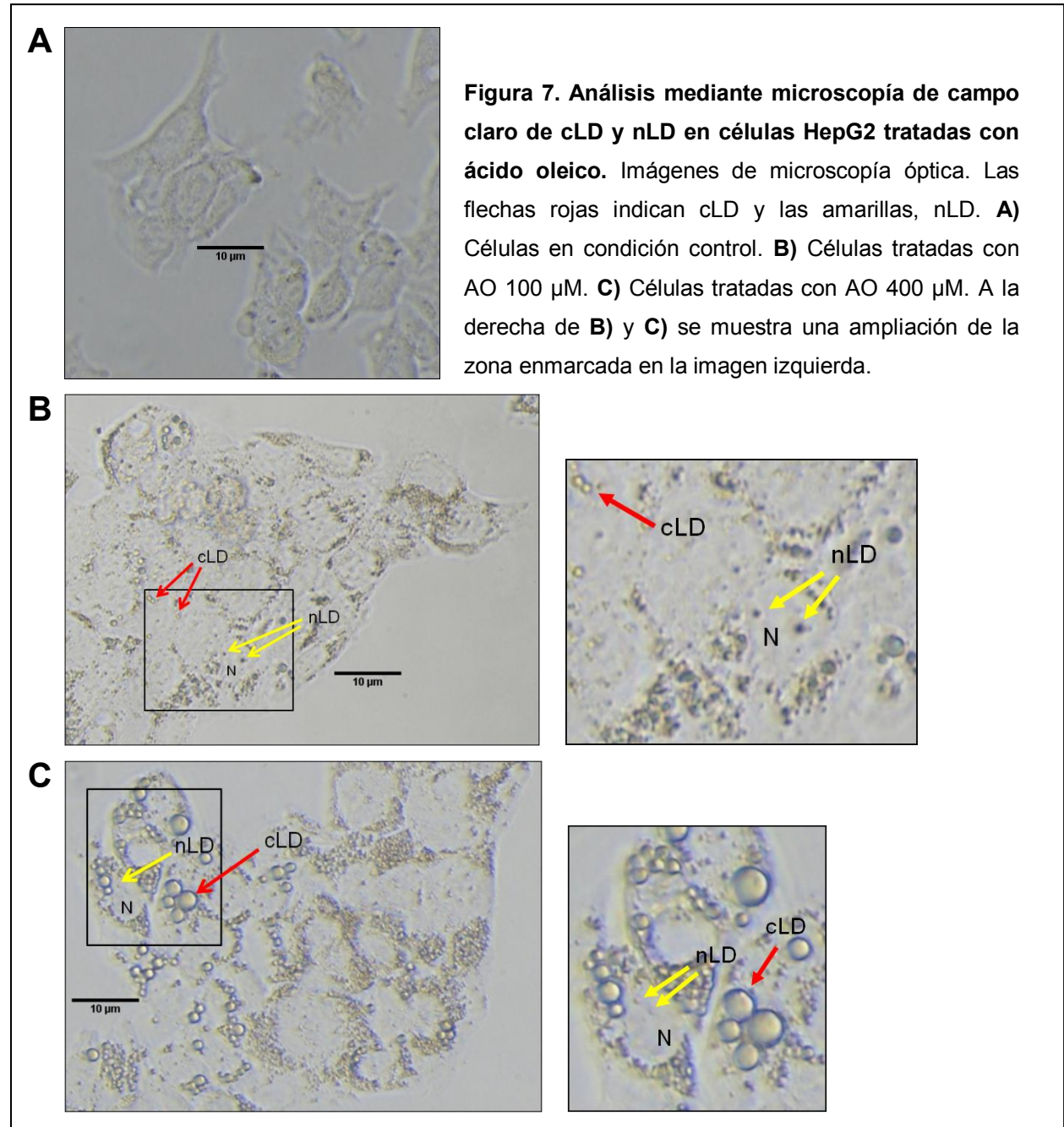


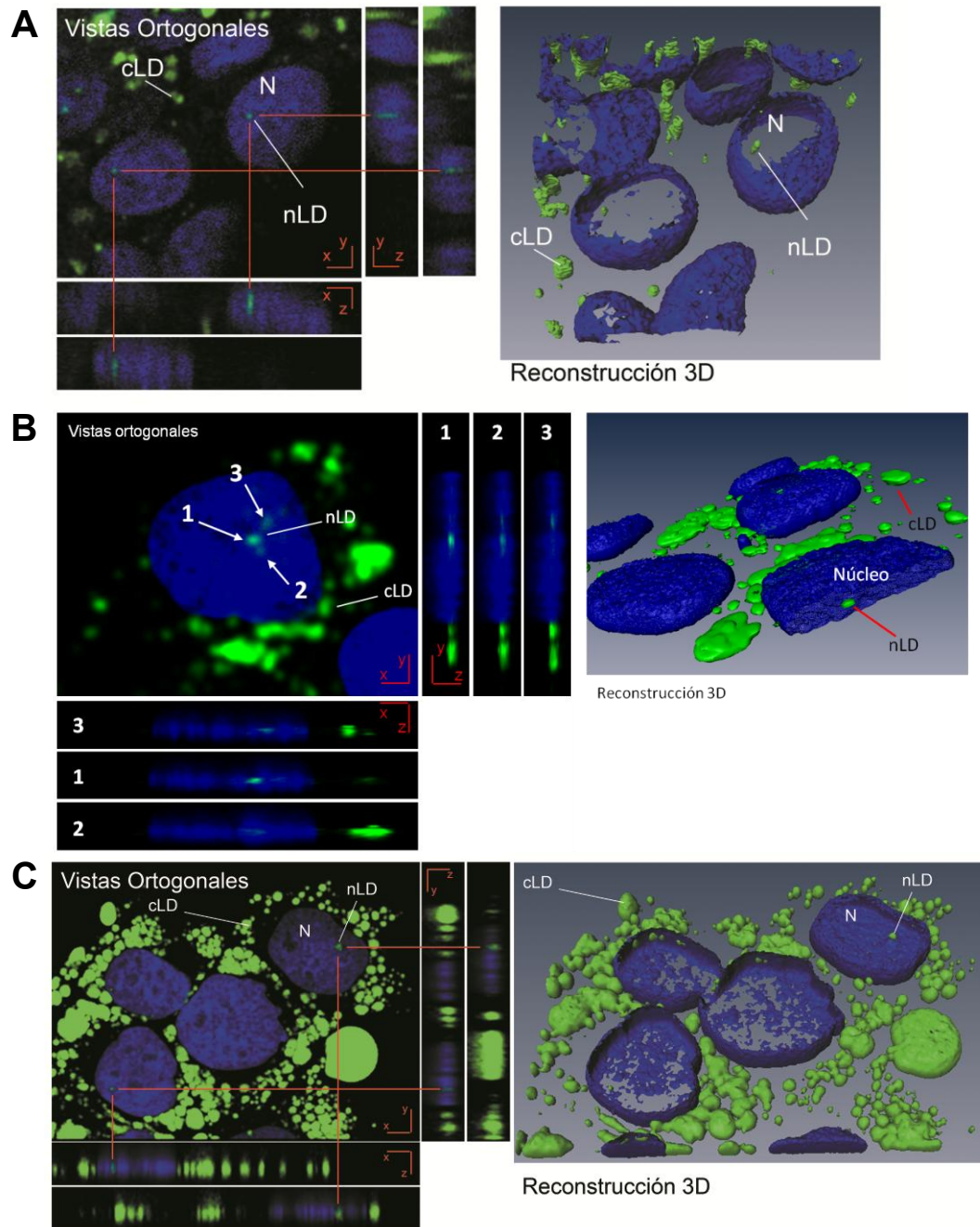
**Figura 6. Protocolo experimental.** Esquema del protocolo llevado a cabo en los distintos tratamientos realizados sobre el cultivo primario de hepatocitos de rata y el cultivo de células HepG2. El control corresponde a células tratadas con el vehículo del ácido oleico y del TriacsinC (etanol y metanol, respectivamente).

Las células se sembraron en condiciones control durante 48 h, y luego el medio se reemplazó por uno suplementado con AO (100  $\mu$ M y 400  $\mu$ M) por 24 h. En las distintas condiciones ensayadas se obtuvieron imágenes de microscopía de campo claro ([Figura 7](#)) y microscopía de fluorescencia confocal ([Figura 8](#)) donde pudo verse la presencia de las nLD en el interior del N celular.

En células HepG2 cultivadas con AO 100  $\mu$ M ([Figura 9](#)) hubo un incremento en el tamaño de ambas LD (la mediana del diámetro fue de 1,02 y 0,77  $\mu$ m, y el diámetro Max 3,8 y 2,1  $\mu$ m en cLD y nLD, respectivamente) ([Figuras 10A y 11A](#)) y en el número (60 y 4, cLD y nLD), que se reflejó en un aumento en el volumen total de LD por célula respecto del control (3 y 2 veces mayor en cLD y nLD, respectivamente) ([Figuras 10C y 11C](#)).

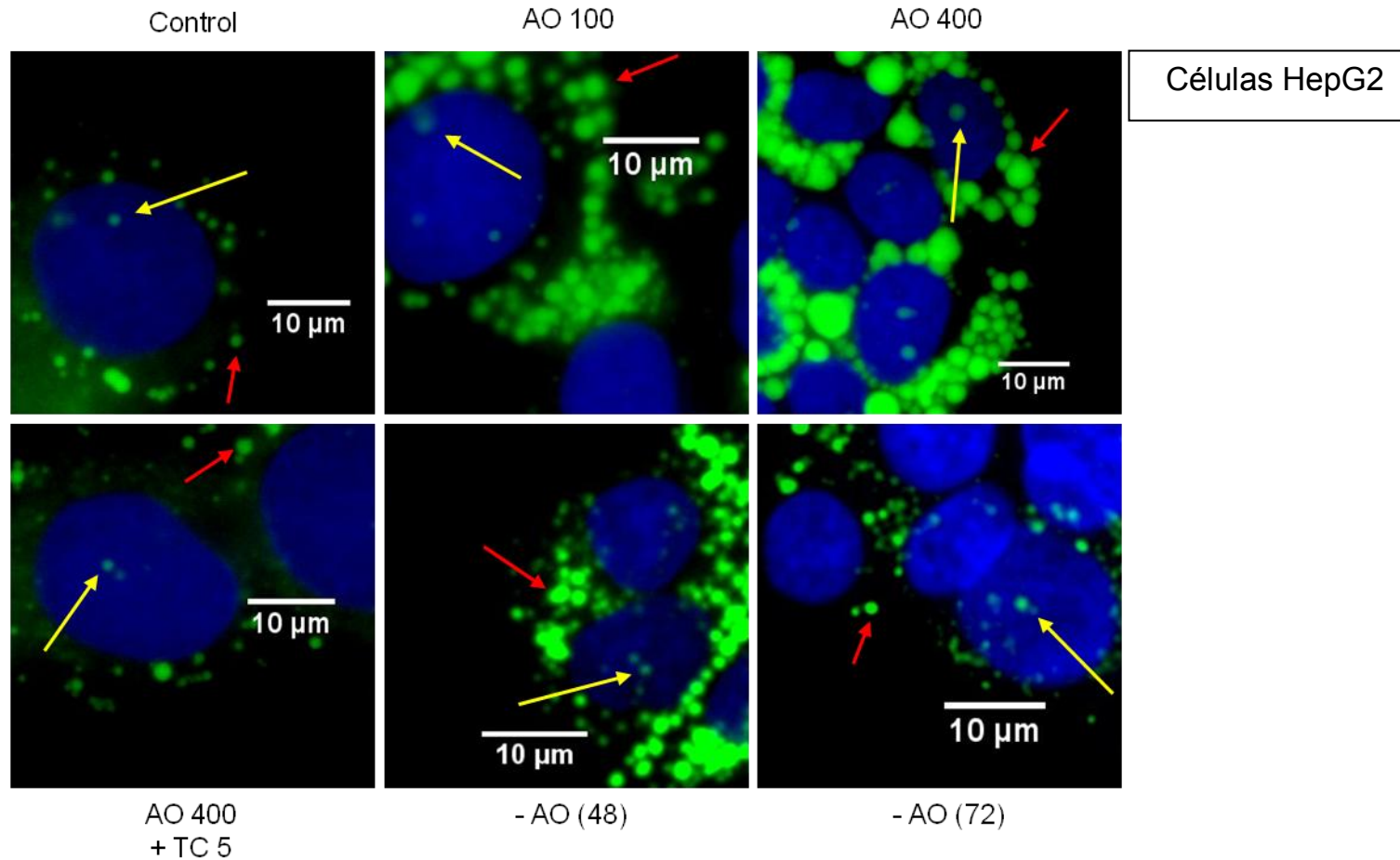
El aumento en el número de nLD y cLD con AO 100  $\mu\text{M}$  puede deberse al crecimiento de LD existentes de menor tamaño que comienzan a hacerse visibles al microscopio, y/o a la génesis *de novo* de LD.



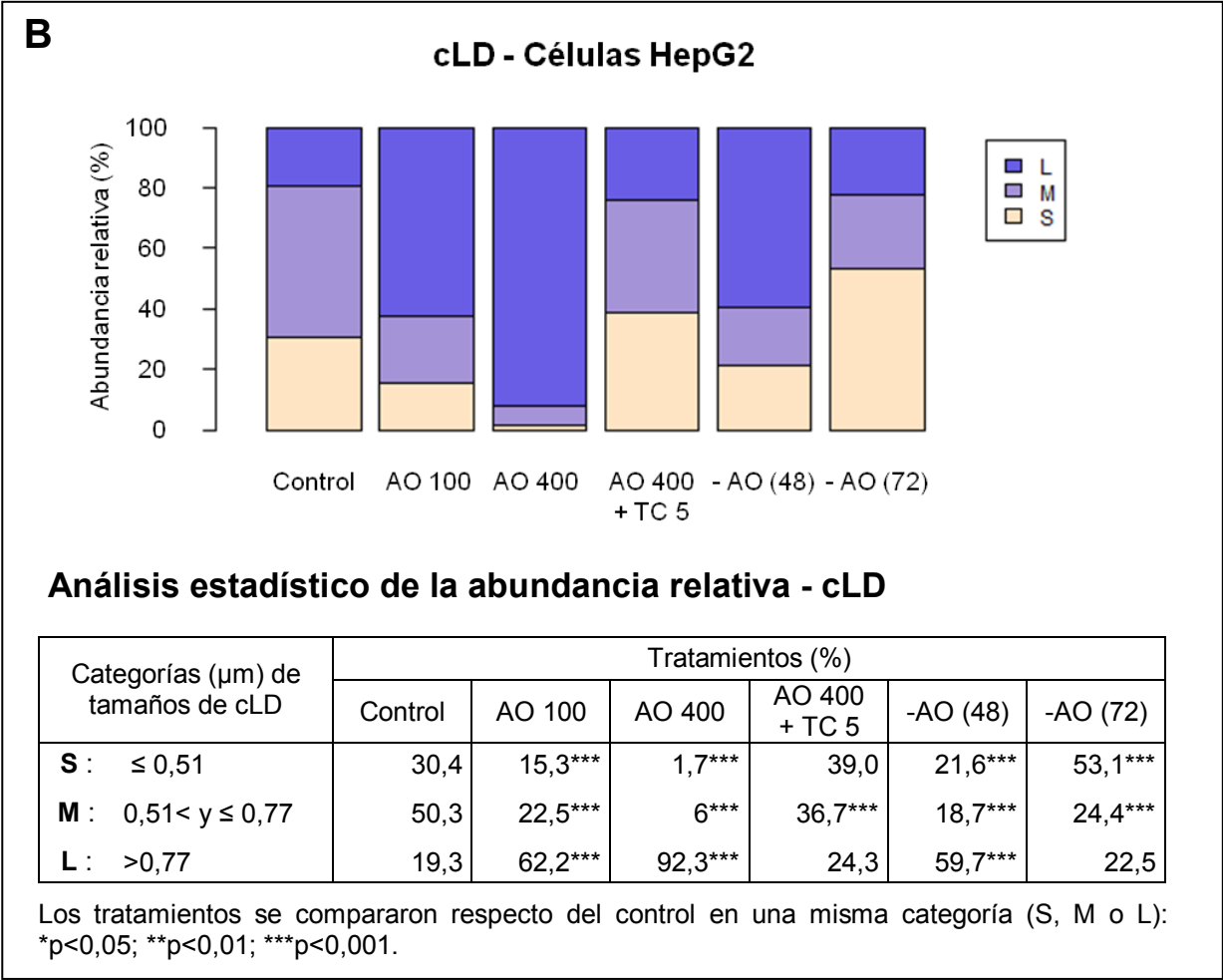
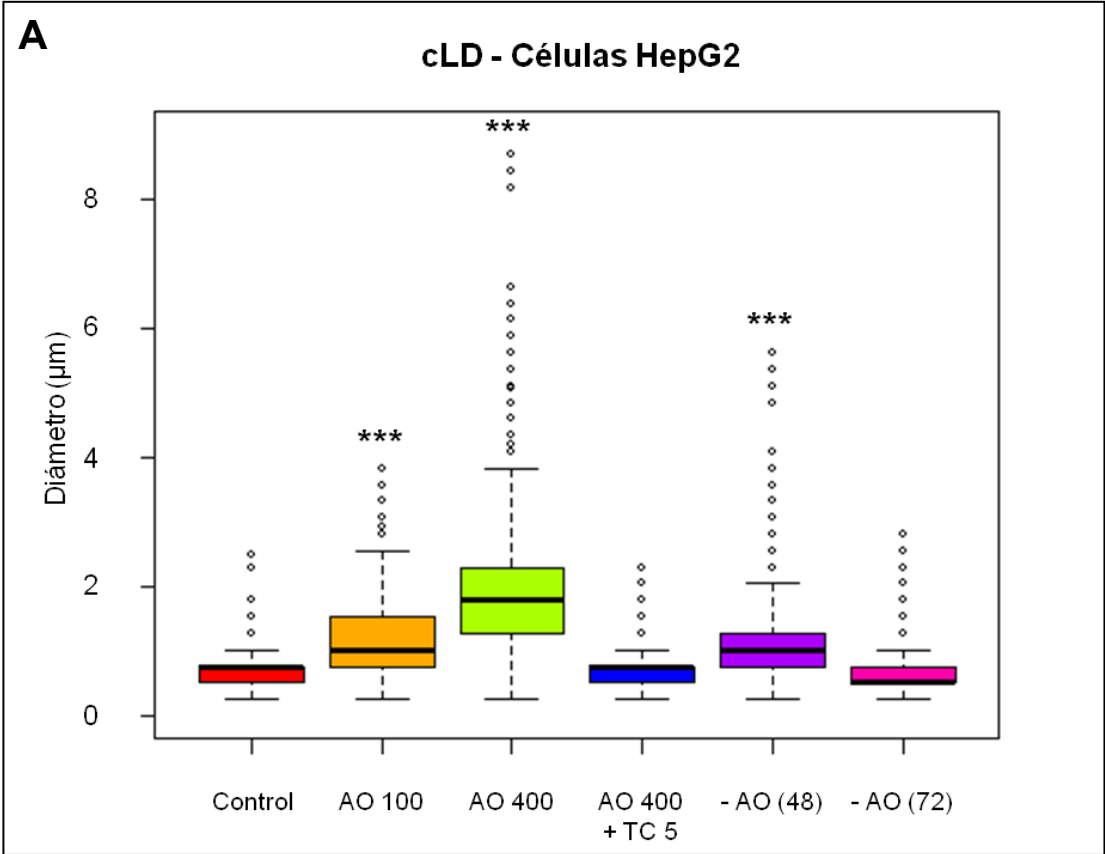


**Figura 8. Análisis mediante microscopía confocal de cLD y nLD en células HepG2 tratadas con ácido oleico.** En azul se observa la tinción de los núcleos con DAPI y en verde, de las nLD y cLD con BODIPY 493/503. A la izquierda, vista general del preparado y reconstrucción de los planos xz e yz en una zona seleccionada del mismo. A la derecha, reconstrucción tridimensional. **A)** Células en condición control. **B)** Células tratadas con AO 100  $\mu$ M. **C)** Células tratadas con AO 400.

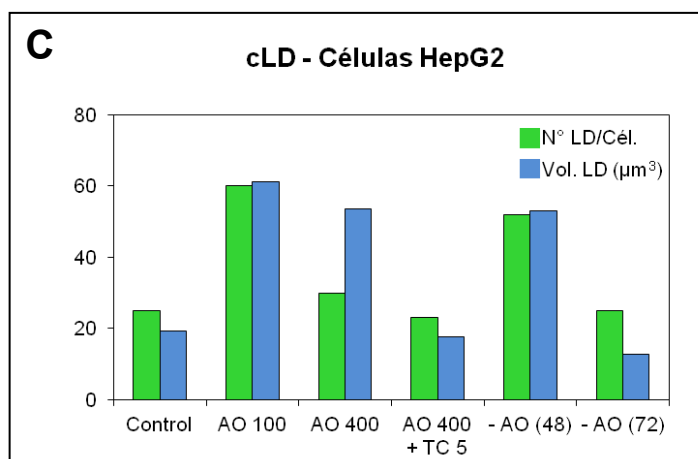




**Figura 9. Análisis mediante microscopía de epifluorescencia de cLD y nLD en células HepG2.** En azul se observa la tinción de los núcleos con DAPI y en verde, de las LD con BODIPY 493/503. Las flechas rojas indican cLD, y las flechas amarillas, nLD. Control: células cultivadas durante 24 h en condiciones control; AO 100: células tratadas por 24 h con AO 100  $\mu\text{M}$ ; AO 400: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu\text{M}$ ; AO 400 +TC 5: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu\text{M}$  y TC 5  $\mu\text{M}$ ; - AO (48), - AO (72): células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu\text{M}$  e incubadas 48 y 72 h post tratamiento en ausencia de AO.





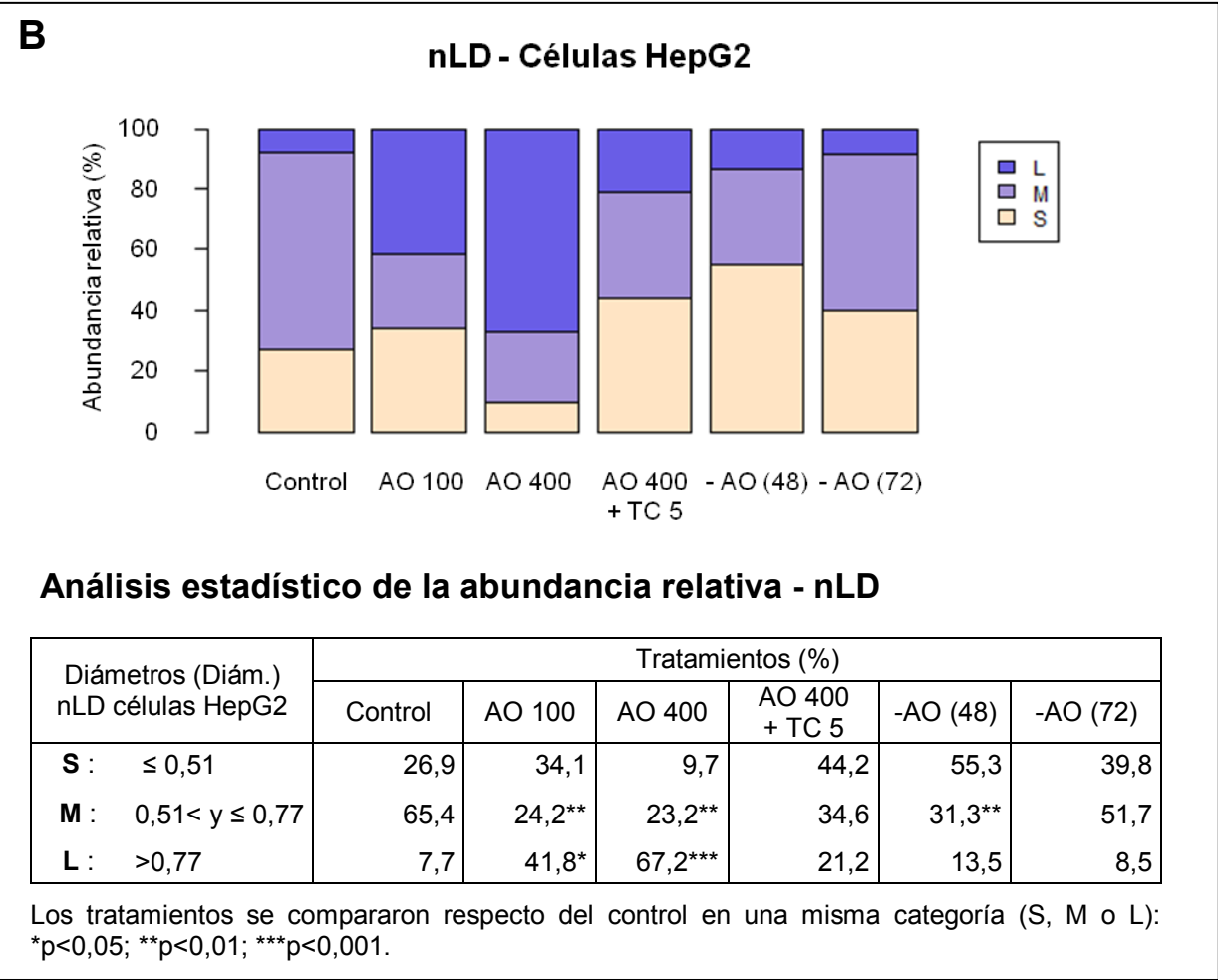
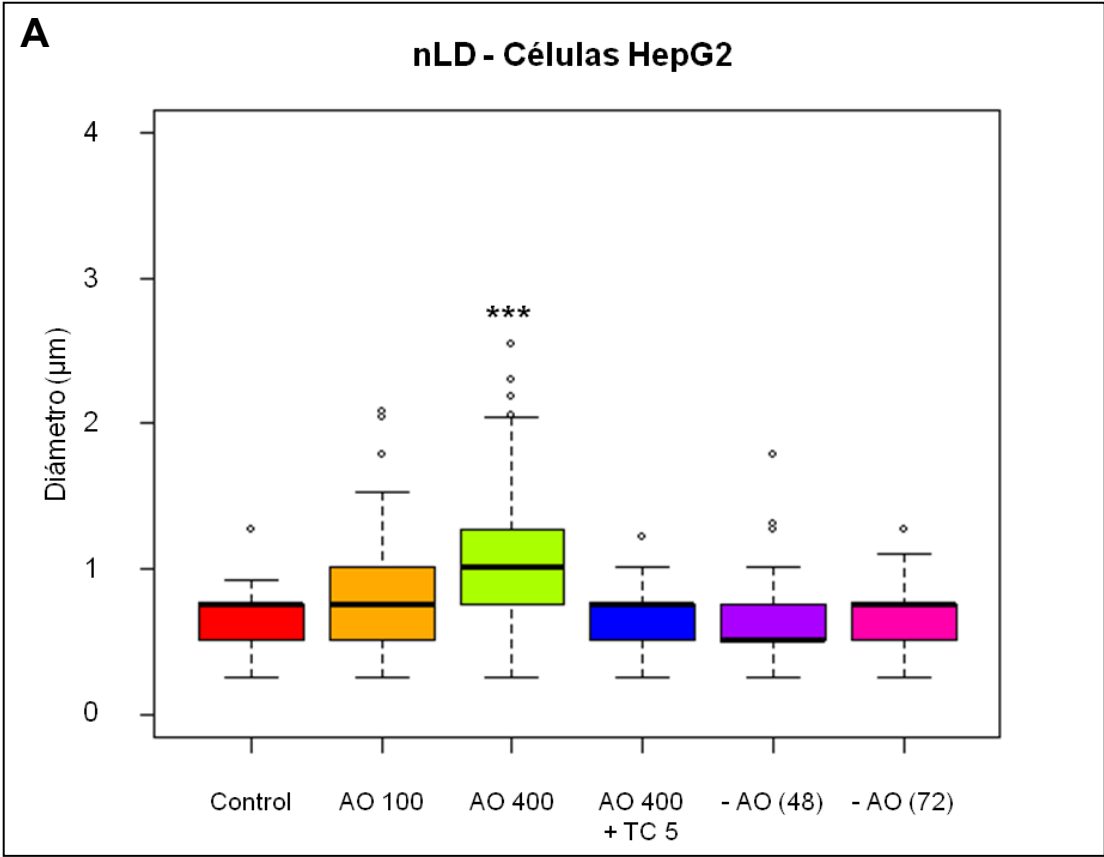


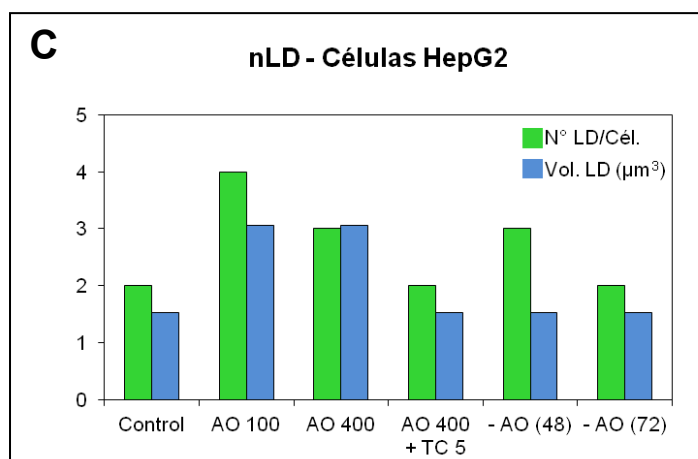
**Figura 10. Análisis de los parámetros morfológicos de cLD en células HepG2 tratadas con AO y el inhibidor TC.** A partir de imágenes de microscopía de epifluorescencia equivalentes a la **Figura 9** se midieron los diámetros (μm) de cLD por célula. Los tratamientos se definieron en la **Figura 6**.

**A) Tamaños (diámetros) de cLD.** En los gráficos de caja (*“box plots”*) se presentan los valores de los cuartiles de los datos, Q1, Q2 y Q3. Q2 se corresponde con el valor de la mediana. El máximo corresponde al mayor valor de diámetro medido presente en la totalidad de las cLD analizadas. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de Kruskal-Wallis, seguido del test Posthoc de Nemenyi. Cada tratamiento se comparó respecto del control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**B) Distribución de tamaños de cLD.** La distribución de los tamaños de la población de cLD se evaluó en base al diámetro (μm) dividiendo a la población de LD en tres categorías, definiendo como punto de corte los valores de los cuartiles Q1 (0,51 μm) y Q3 (0,77 μm) de los datos, S (*“small”*):  $\leq 0,51$ ; M (*“medium”*):  $> 0,51$  y  $\leq 0,77$ ; L (*“large”*):  $> 0,77$ . Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de proporciones con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Tabla). Los tratamientos se compararon respecto del control en una misma categoría (S, M o L): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**C) Cuantificación del número y volumen total de cLD por célula.** El volumen total (μm³) de cLD por célula se calculó multiplicando el volumen de una LD ideal (cuyo diámetro es el de la mediana de la población y el volumen el de una esfera) por el número de gotas (media) por célula.





**Figura 11. Análisis de los parámetros morfológicos de nLD en células HepG2 tratadas con AO y el inhibidor TC.** A partir de imágenes de microscopía de epifluorescencia equivalentes a la **Figura 9** se midieron los diámetros (μm) de nLD por célula. Los tratamientos se definieron en la **Figura 6**.

**A) Tamaños (diámetros) de nLD.** En los gráficos de caja (*“box plots”*) se presentan los valores de los cuartiles de los datos, Q1, Q2 y Q3. Q2 se corresponde con el valor de la mediana. El máximo corresponde al mayor valor de diámetro medido presente en la totalidad de las nLD analizadas. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de Kruskal-Wallis, seguido del test Posthoc de Nemenyi. Cada tratamiento se comparó respecto del control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**B) Distribución de tamaños de nLD.** La distribución de los tamaños de la población de nLD se evaluó en base al diámetro (μm) dividiendo a la población de LD en tres categorías, definiendo como punto de corte los valores de los cuartiles Q1 (0,51 μm) y Q3 (0,77 μm) de los datos, S (*“small”*):  $\leq 0,51$ ; M (*“medium”*):  $> 0,51$  y  $\leq 0,77$ ; L (*“large”*):  $> 0,77$ . Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de proporciones con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Tabla). Los tratamientos se compararon respecto del control en una misma categoría (S, M o L): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**C) Cuantificación del número y volumen total de nLD por célula.** El volumen total (μm³) de nLD por célula se calculó multiplicando el volumen de una LD ideal (cuyo diámetro es el de la mediana de la población y el volumen el de una esfera) por el número de gotas (media) por célula.

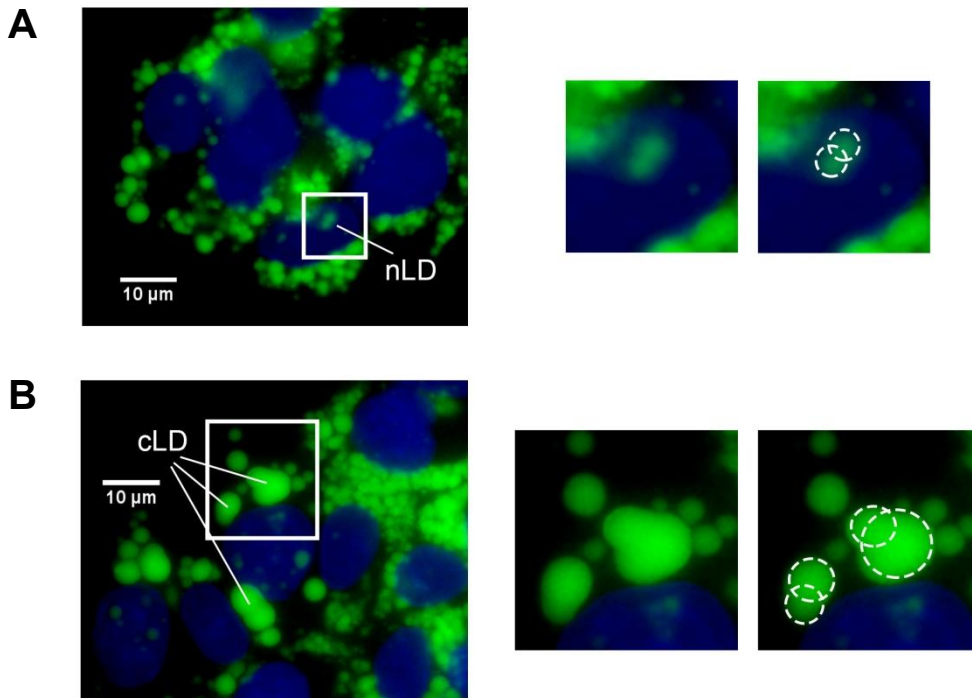
Cuando se aumentó la concentración de AO a 400 μM, los aumentos en el tamaño de ambos tipos de LD fueron dramáticos, la mediana del diámetro fue de 1,79 y 1,02 μm, el Max fue de 8,7 μm y 2,6 μm (**Figuras 10A y 11A**), y el volumen total se incrementó en 3 y 2 veces en cLD y nLD (**Figuras 10C y 11C**), respectivamente, en comparación a la condición control. Estos resultados están de acuerdo con datos de bibliografía, ya que en células de hepatocarcinoma humano se observó que los diámetros de las cLD aumentan de 0,54 μm a 1,9 μm en respuesta

al tratamiento por 24 h con una mezcla de ácidos grasos palmítico y oleico 500  $\mu\text{M}$  [60].

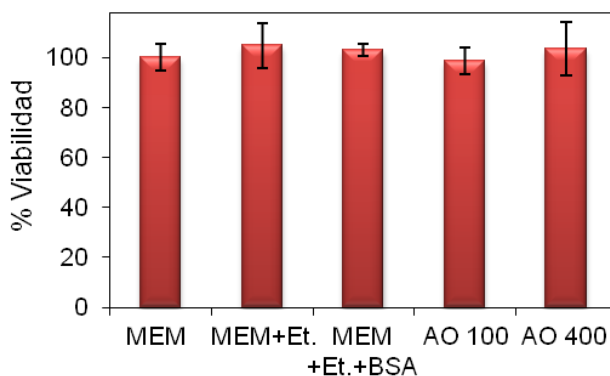
En cuanto a la distribución de la población de LD, en las células HepG2 tratadas con AO (100 y 400  $\mu\text{M}$ ) aumentó la proporción de cLD y nLD grandes (L) respecto del control, dicho aumento fue mayor a mayor concentración de AO (Figuras 10B y 11B). En particular, en células tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$  el 92% de las cLD y el 67% de las nLD son grandes (L).

En particular, tanto en el núcleo como en el citosol de células tratadas con AO 100  $\mu\text{M}$  hay un mayor número de LD respecto a la condición control, y además estas poseen un menor tamaño que aquellas de células tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$ ; en tanto que el número de LD en AO 400  $\mu\text{M}$  es semejante al del control. Por esta razón, al considerar el volumen total de cLD y nLD calculado por célula observamos que este es similar en las dos condiciones testeadas (100 y 400  $\mu\text{M}$ ). Por lo tanto, podemos suponer que en los tratamientos con AO 400  $\mu\text{M}$  hubo fusión de cLD chicas que determinó que disminuyera su número y así se formaran LD más grandes (mayor mediana del diámetro y mayor Max). En el N, por efecto del AO las nLD deben haberse fusionado en nLD más grandes. En la Figura 12 se observan claramente cLD y nLD fusionándose en sus respectivos compartimentos, en células tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$ . Es probable que este aumento en el volumen total de cLD y nLD haya implicado un incremento en la masa de las LD.

La viabilidad celular se evaluó mediante el recuento de células en cámara de Neubauer. Dado que para todas las concentraciones ensayadas el porcentaje de células que excluyeron el colorante (células viables) durante el recuento fue igual o mayor al 90%, se consideró el número de células viables como el número de células totales presentes. Los resultados muestran que la viabilidad no fue afectada en las siguientes condiciones ensayadas: a) presencia del vehículo del AO (BSA), b) solvente en el que estaba disuelto el AO (etanol), c) AO 100 y 400  $\mu\text{M}$  (Figura 13).



**Figura 12. Fusión de cLD y nLD en células HepG2 tratadas con AO 400  $\mu$ M.** Análisis mediante microscopía de epifluorescencia. En azul se observa la tinción de los núcleos con DAPI y en verde, de las LD con BODIPY 493/503. Se observa la fusión de nLD (**A**) y cLD (**B**) por efecto del ácido oleico. A la derecha se observa una ampliación de la zona enmarcada en la imagen izquierda, en la que se delimitan mediante círculos las gotas que se encuentran participando del proceso de fusión.



**Figura 13. Viabilidad de células HepG2 tratadas con AO.** La viabilidad celular se determinó por recuento celular en cámara de Neubauer. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  DS ( $n=3$ ). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de ANOVA seguido del test Posthoc de comparación de medias de Tukey ( $p<0,05$ ). MEM: células incubadas en medio de cultivo; MEM+Et.: células en medio suplementado con el vehículo etanol; MEM+Et.+BSA: células en medio suplementado con los vehículos etanol y BSA; AO 100: células tratadas por 24 h con AO 100  $\mu$ M; AO 400: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu$ M.

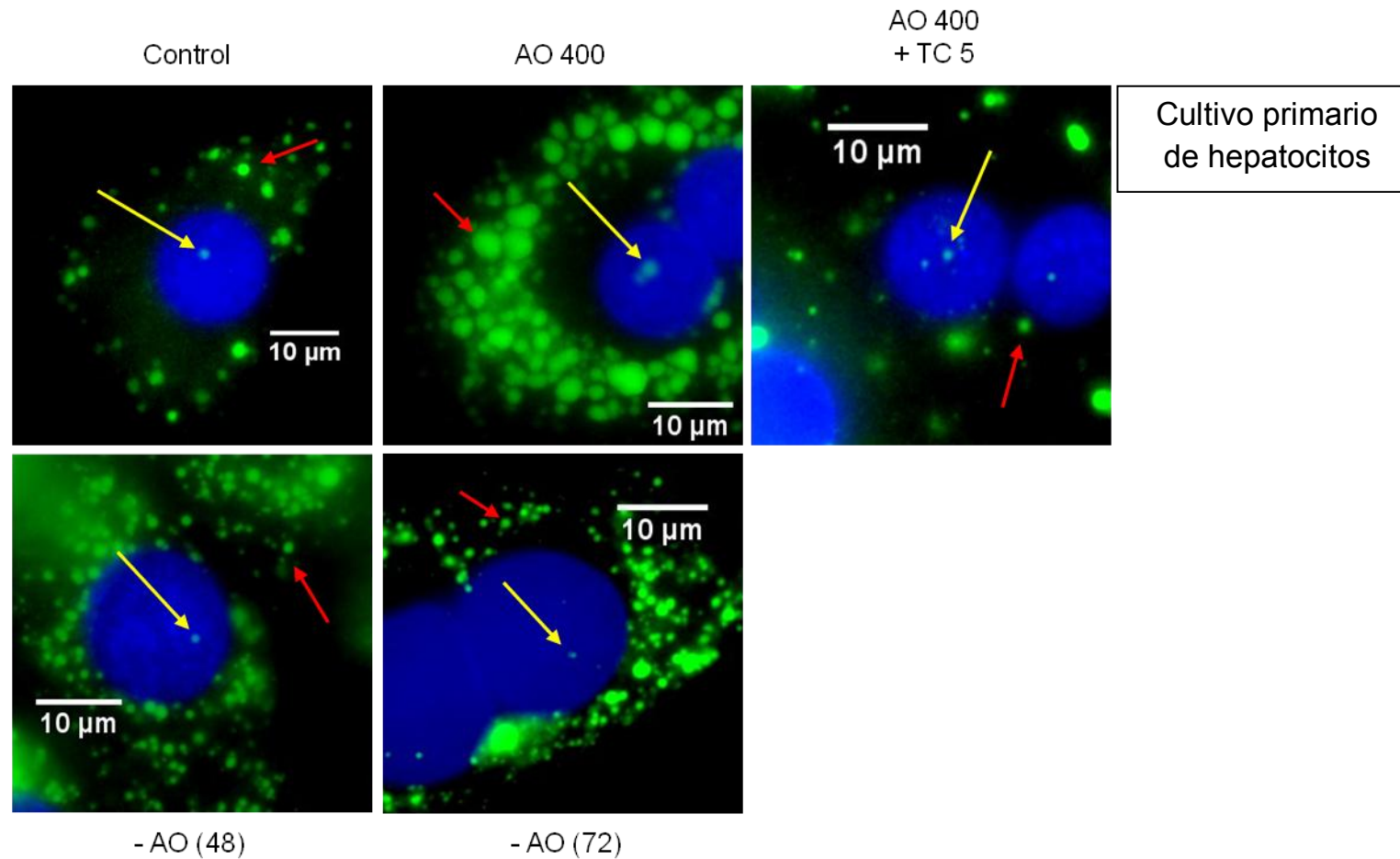
## **Hepatocitos**

Se cultivaron hepatocitos de rata como se detalla en la [Figura 6](#).

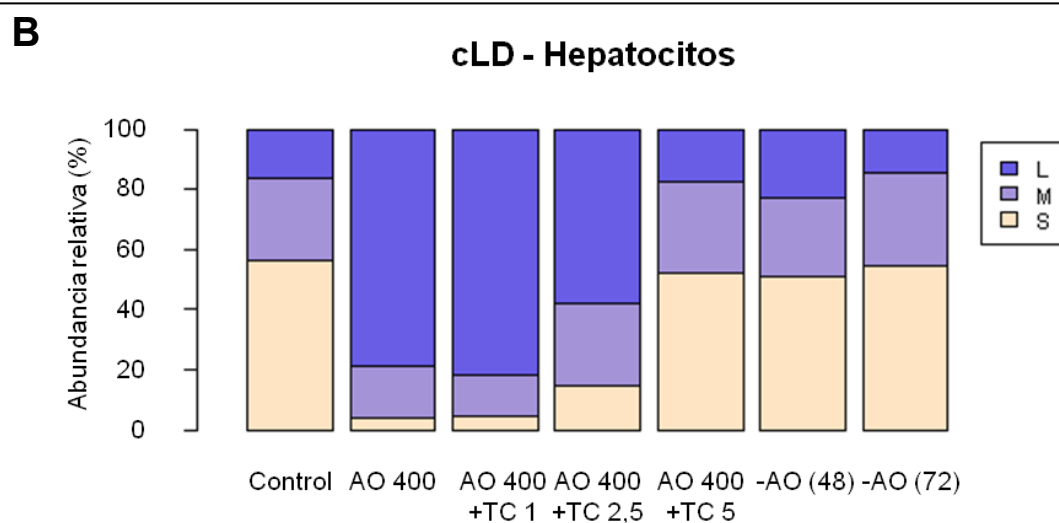
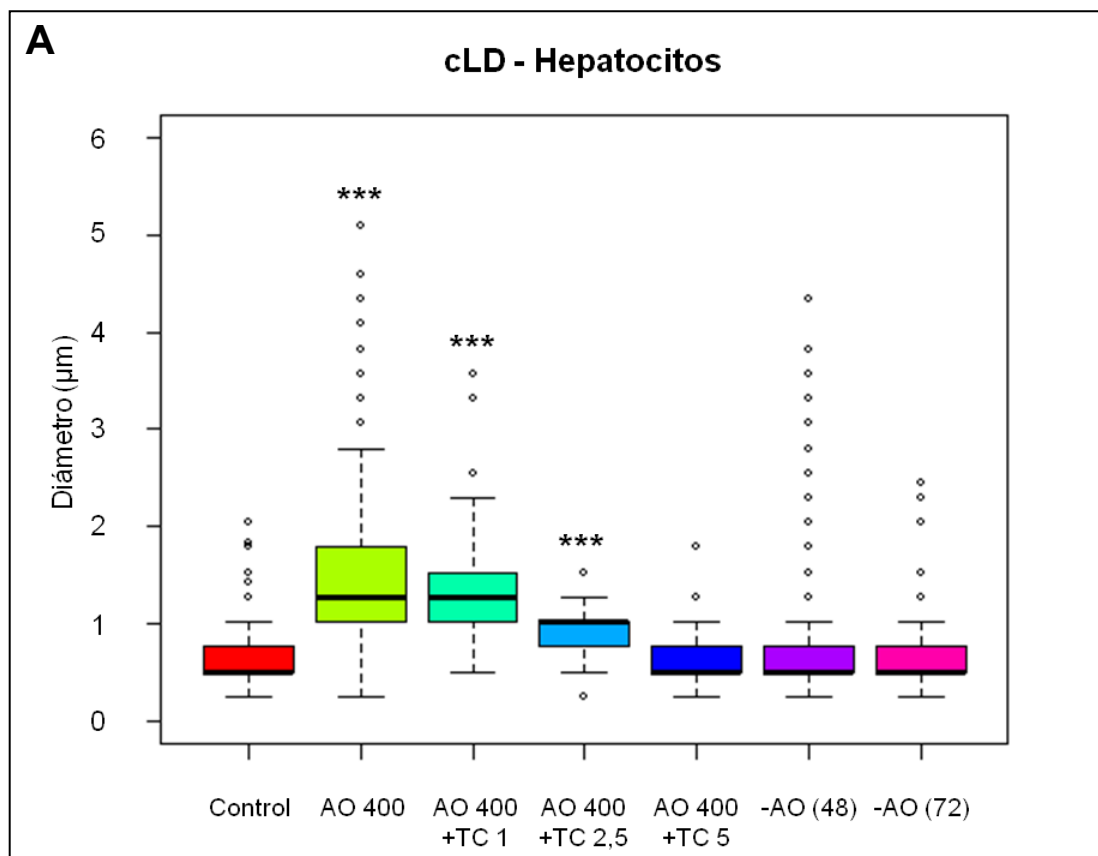
Teniendo en cuenta que en células HepG2 los cambios fenotípicos más contrastantes se desarrollaron cuando las células fueron tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$ , se incubaron hepatocitos con esta concentración de AO y se repitieron las determinaciones.

En hepatocitos tratados con AO 400  $\mu\text{M}$  ([Figura 14](#)) hubo un aumento en el tamaño ([Figura 15A](#)) y en el número de cLD (mediana del diámetro: 1,28  $\mu\text{m}$ , Max: 5,1  $\mu\text{m}$  y 77 cLD por célula), que se reflejó en un aumento en el volumen total de cLD por célula respecto del control (6 veces mayor) ([Figura 15C](#)), y que probablemente implicó un aumento en la masa de las cLD. El número de nLD disminuyó a 1 respecto del control (3 nLD), y la mediana del diámetro aumentó (1,28  $\mu\text{m}$ ) ([Figura 16A](#)), en tanto que el volumen total de nLD por célula fue similar al del control ([Figura 16C](#)). Por lo tanto, podemos suponer que por efecto de AO 400  $\mu\text{M}$ , las 3 nLD que había en el N de las células control se fusionaron y generaron una nLD grande (mayor Max).

En hepatocitos tratados con AO 400  $\mu\text{M}$  se modificaron drásticamente las características de la población de LD, ya que la población mayoritaria de cLD y nLD que en el control era la S, luego del tratamiento fue la constituida por LD L (cLD: L:79%>M:17%>S:4%; nLD: L:76%>M:22%~S:2%) ([Figuras 15B y 16B](#)). Es decir que luego del tratamiento con AO la distribución de la población de cLD y de nLD fue la misma (L>M≥S).



**Figura 14. Análisis mediante microscopía de epifluorescencia de cLD y nLD en cultivo primario de hepatocitos de rata.** En azul se observa la tinción de los núcleos con DAPI y en verde, de las LD con BODIPY 493/503. Las flechas rojas indican cLD, y las flechas amarillas nLD. Control: células cultivadas durante 24 h en condiciones control; AO 400: células tratadas por 24 h con AO 400 µM; AO 400 + TC 5: células tratadas por 24 h con AO 400 µM y TC 5 µM; - AO (48), - AO (72): células tratadas por 24 h con AO 400 µM e incubadas 48 y 72 h post tratamiento en ausencia del mismo.

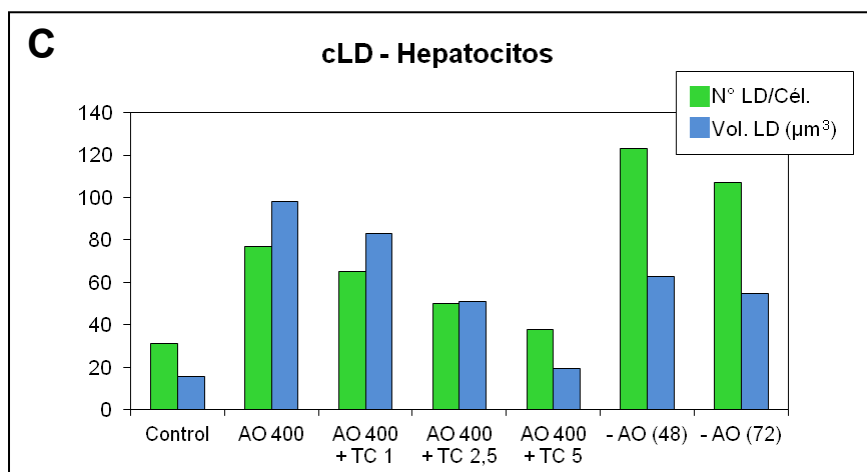


### Análisis estadístico de la abundancia relativa - cLD

Categorías (µm) de tamaños de cLD	Tratamientos (%)						
	Control	AO 400	AO 400 + TC 1	AO 400 + TC 2,5	AO 400 + TC 5	-AO (48)	-AO (72)
<b>S</b> : ≤ 0,51	56,4	4,2***	4,9***	15,0***	52,0	51,2	54,3
<b>M</b> : 0,51 < y ≤ 0,77	27,4	17,1***	13,3***	27,1*	30,3	25,9	31,3
<b>L</b> : > 0,77	16,2	78,8***	81,8***	57,9***	17,7	22,9*	14,4

Los tratamientos se compararon respecto del control en una misma categoría (S, M o L):  
 \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.



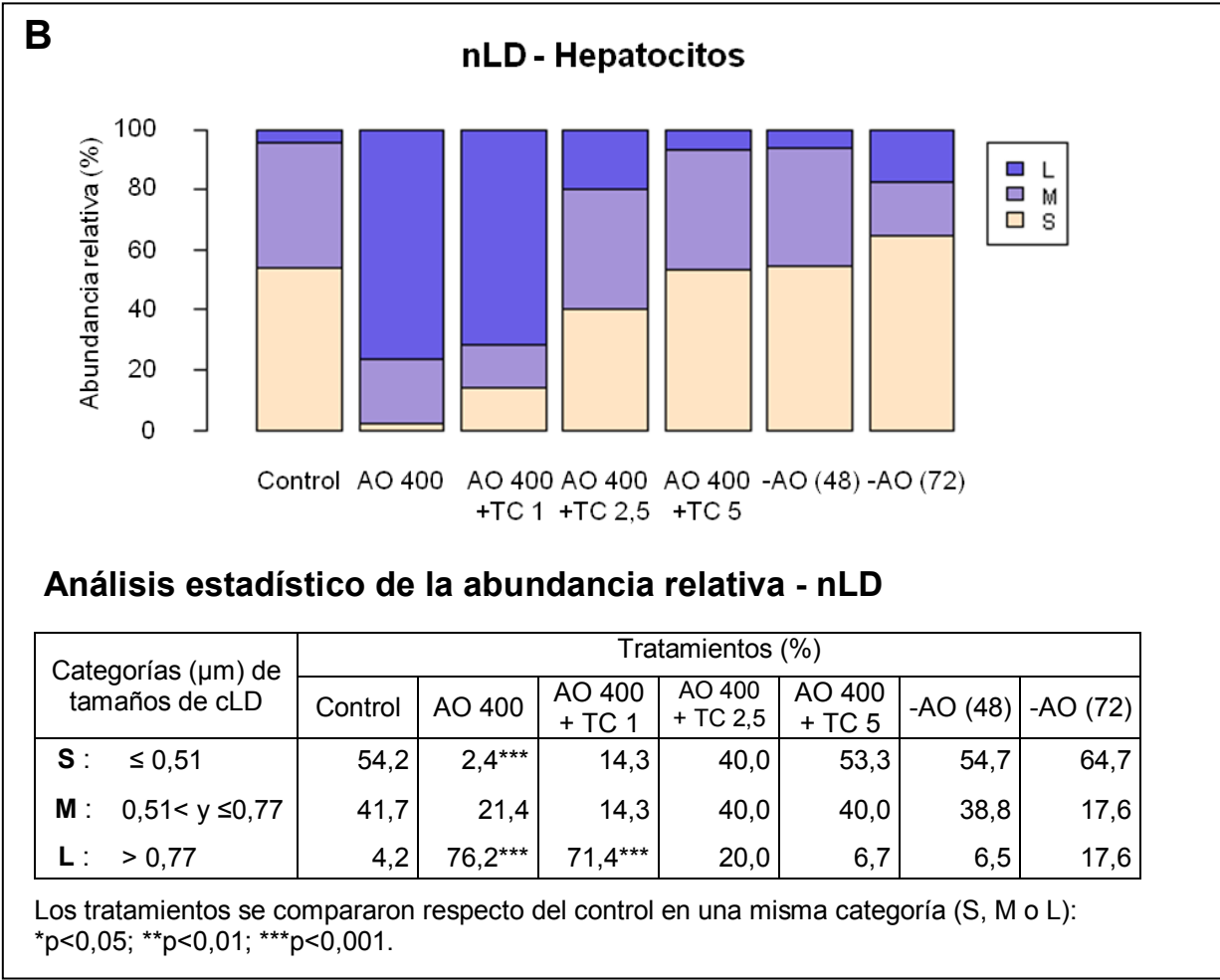
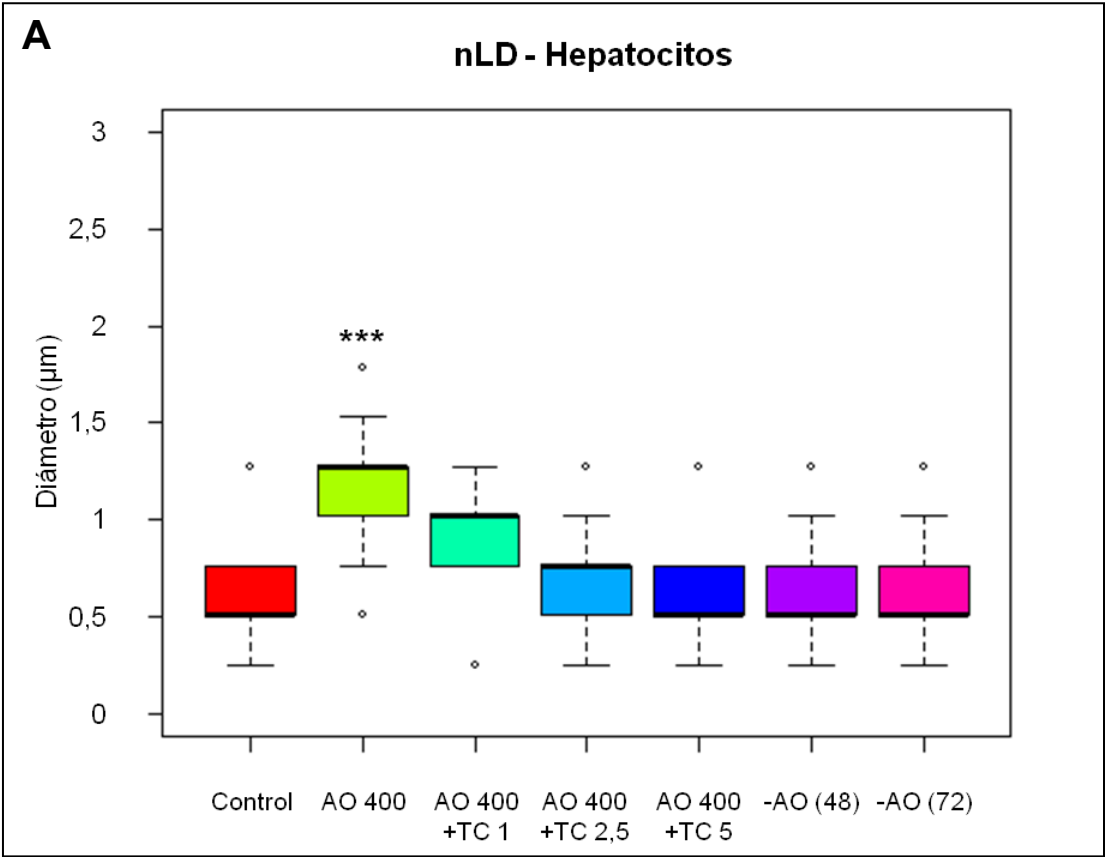


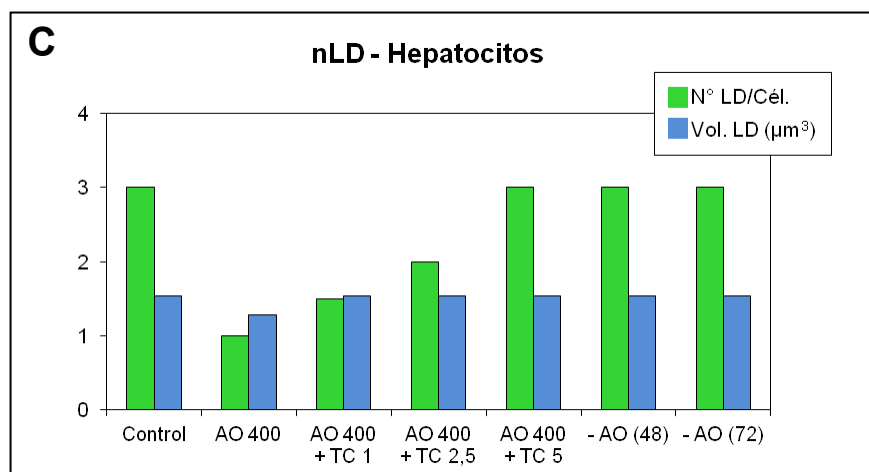
**Figura 15. Análisis de los parámetros morfológicos de cLD en cultivo primario de hepatocitos de rata tratados con AO y el inhibidor TC.** A partir de imágenes de microscopía de epifluorescencia equivalentes a la **Figura 14** se midieron los diámetros (µm) de cLD por célula. Los tratamientos se definieron en la **Figura 6**.

**A) Tamaños (diámetros) de cLD.** En los gráficos de caja (*“box plots”*) se presentan los valores de los cuartiles de los datos, Q1, Q2 y Q3. Q2 se corresponde con el valor de la mediana. El máximo corresponde al mayor valor de diámetro medido presente en la totalidad de las cLD analizadas. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de Kruskal-Wallis, seguido del test Posthoc de Nemenyi. Cada tratamiento se comparó respecto del control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**B) Distribución de tamaños de cLD.** La distribución de los tamaños de la población de cLD se evaluó en base al diámetro (µm) dividiendo a la población de LD en tres categorías, definiendo como punto de corte los valores de los cuartiles Q1 (0,51 µm) y Q3 (0,77 µm) de los datos, S (*“small”*):  $\leq 0,51$ ; M (*“medium”*):  $> 0,51$  y  $\leq 0,77$ ; L (*“large”*):  $> 0,77$ . Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de proporciones con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Tabla). Los tratamientos se compararon respecto del control en una misma categoría (S, M o L): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**C) Cuantificación del número y volumen total de cLD por célula.** El volumen total (µm³) de cLD por célula se calculó multiplicando el volumen de una LD ideal (cuyo diámetro es el de la mediana de la población y el volumen el de una esfera) por el número de gotas (media) por célula.





**Figura 16. Análisis de los parámetros morfológicos de nLD en cultivo primario de hepatocitos de rata tratadas con AO y el inhibidor TC.** A partir de imágenes de microscopía de epifluorescencia equivalentes a la **Figura 14** se midieron los diámetros (μm) de nLD por célula. Los tratamientos se definieron en la **Figura 6**.

**A) Tamaños (diámetros) de nLD.** En los gráficos de caja (*“box plots”*) se presentan los valores de los cuartiles de los datos, Q1, Q2 y Q3. Q2 se corresponde con el valor de la mediana. El máximo corresponde al mayor valor de diámetro medido presente en la totalidad de las nLD analizadas. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de Kruskal-Wallis, seguido del test Posthoc de Nemenyi. Cada tratamiento se comparó respecto del control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**B) Distribución de tamaños de nLD.** La distribución de los tamaños de la población de nLD se evaluó en base al diámetro (μm) dividiendo a la población de LD en tres categorías, definiendo como punto de corte los valores de los cuartiles Q1 (0,51 μm) y Q3 (0,77 μm) de los datos, S (*“small”*):  $\leq 0,51$ ; M (*“medium”*):  $> 0,51$  y  $\leq 0,77$ ; L (*“large”*):  $> 0,77$ . Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de proporciones con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Tabla). Los tratamientos se compararon respecto del control en una misma categoría (S, M o L): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**C) Cuantificación del número y volumen total de nLD por célula.** El volumen total (μm³) de nLD por célula se calculó multiplicando el volumen de una LD ideal (cuyo diámetro es el de la mediana de la población y el volumen el de una esfera) por el número de gotas (media) por célula.

Es interesante resaltar que como resultado del tratamiento con AO 400  $\mu\text{M}$ , en cLD de hepatocitos el aumento en la mediana del diámetro (de 0,51  $\mu\text{m}$  a 1,28  $\mu\text{m}$ ) y el Max (de 2  $\mu\text{m}$  a 5,1  $\mu\text{m}$ ) no fueron tan drásticos en comparación con las cLD de células HepG2 (de 0,77  $\mu\text{m}$  a 1,79  $\mu\text{m}$  en la mediana del diámetro, y de 2,5  $\mu\text{m}$  a 8,7  $\mu\text{m}$  en el Max), en tanto que en hepatocitos el número de cLD aumentó (77 cLD) respecto al control (31 cLD), mientras que en células HepG2 el número de cLD en células tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$  fue semejante al de la condición control. Esto generó un aumento del volumen total de cLD por célula de 6 veces en hepatocitos, y 3 veces en células HepG2 (ambos respecto a su control).

En cuanto a las nLD de células tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$ , en hepatocitos hubo un aumento de la mediana del diámetro (de 0,51  $\mu\text{m}$  a 1,28  $\mu\text{m}$ ) y en el Max (de 1,3  $\mu\text{m}$  a 1,8  $\mu\text{m}$ ), y una disminución en el número de nLD (de 3 a 1), lo que determinó que el volumen total de nLD fuera semejante al de la condición control. En tanto que en células HepG2 hubo un aumento en la mediana del diámetro (de 0,77  $\mu\text{m}$  a 1,02  $\mu\text{m}$ ), en el Max (de 1,3  $\mu\text{m}$  a 2,6  $\mu\text{m}$ ) y un aumento en el número (de 2 a 4), lo que determinó un aumento del volumen total de nLD por célula (2 veces respecto al control).

#### **Conclusión (4.4.1.)**

Las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico que responde a estímulos externos. Las nLD y cLD aumentan su número y tamaño en respuesta al AO externo mediante un mecanismo que incluye fusión de LD pequeñas.

Los cambios en las nLD por efecto del AO son menores que los de las cLD.

El metabolismo de las nLD estaría coordinado con el de las cLD.

Los cambios en el tamaño Max de nLD y cLD en hepatocitos por efecto del AO están más regulados/restringidos que los de las células HepG2.

Teniendo en cuenta que con AO 400  $\mu\text{M}$  el volumen total de LD por célula aumentó respecto a la condición control, es probable que se haya incrementado la masa de las LD.

#### 4.4.2. El efecto del AO es reversible

Habiendo determinado que las cLD y nLD aumentan su número y tamaño en respuesta al tratamiento con AO, el siguiente objetivo fue determinar si el efecto del AO es reversible, recuperándose el fenotipo celular original. Con este fin se testeó la siguiente hipótesis:

*El efecto del AO sobre las características morfológicas de las nLD y cLD es reversible*

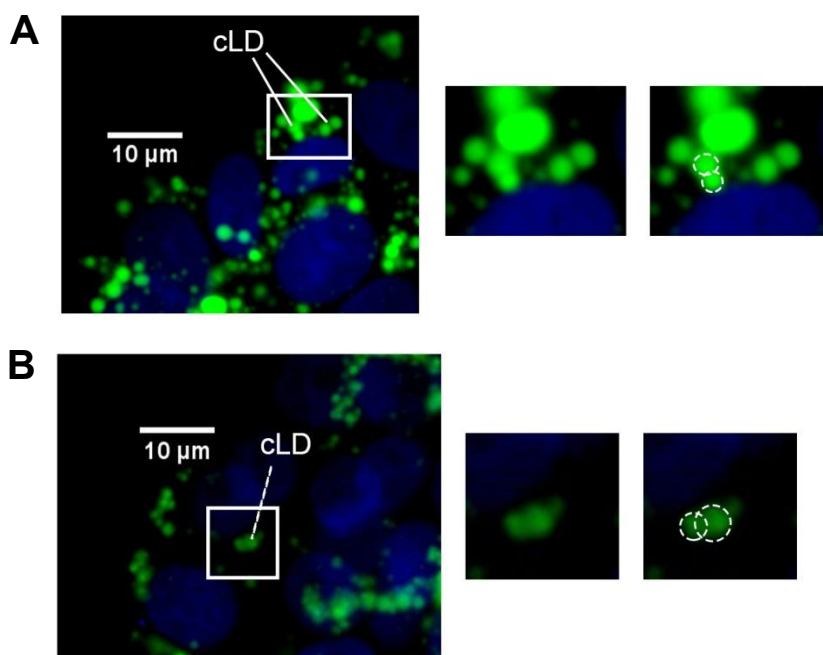
Se sembraron células HepG2 y hepatocitos en condiciones control durante 48 h, luego el medio se reemplazó por uno con AO 400  $\mu\text{M}$  (24 h) y finalmente las células se incubaron en un medio sin AO durante 24, 48 o 72 h, como se detalla en la [Figura 6](#). En ambos tipos celulares luego de 24 h de incubación sin AO (-AO (24)) no se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros morfológicos evaluados respecto del control, mientras que a las 48 h (-AO (48)) y 72 h (-AO (72)) post tratamiento con AO hubo cambios significativos que se analizan a continuación.

##### **Células HepG2**

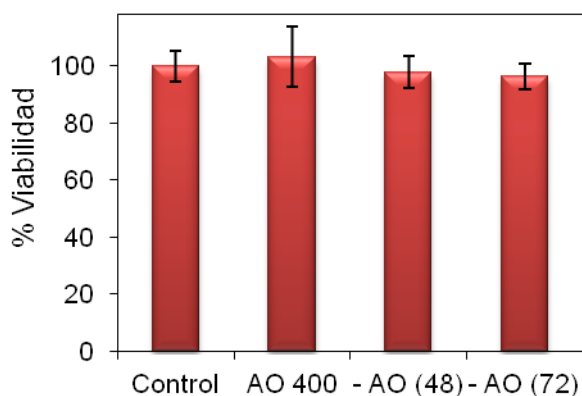
En células HepG2 los incrementos producidos en las LD por el tratamiento con AO 400  $\mu\text{M}$  se revirtieron totalmente cuando el AO fue excluido del medio de cultivo durante 72 h, ya que en esas condiciones de cultivo, los parámetros morfológicos y la distribución de las poblaciones de cLD y nLD fueron semejantes a las del control ([Figura 9](#)). Sin embargo, en células incubadas en ausencia de AO por 48 h los parámetros evaluados en cLD se revirtieron parcialmente. En -AO (48) se observó un importante aumento en el número de cLD de menor tamaño (la mediana del diámetro fue de 1,02  $\mu\text{m}$ , el Max de 5,6  $\mu\text{m}$  y Vol. 53  $\mu\text{m}^3$ ) respecto de las tratadas con AO 400 (mediana del diámetro 1,79  $\mu\text{m}$ , Max 8,7  $\mu\text{m}$  y Vol. 54  $\mu\text{m}^3$ ) ([Figuras 10A y 10C](#)). Estos cambios determinaron que en la población de cLD aumentara la proporción de gotas pequeñas (L:60%>S:21%~M:19%) respecto de AO 400 (L:92%>M:6%>S:2%) ([Figura 10B](#)). Por lo tanto, teniendo en cuenta que el volumen total de cLD es similar en -AO (48) respecto a AO 400, podemos suponer

que en  $-AO$  (48) de las 30 cLD (Max 8,7  $\mu\text{m}$ ) que había en el citosol por efecto del AO 400  $\mu\text{M}$ , parte se fisionaron y generaron 52 cLD más chicas (Max 5,6  $\mu\text{m}$ ). Confirmando estos datos, en la [Figura 17A](#) se observa una cLD fisionándose en 2, y a la derecha, dos cLD muy próximas entre sí que sugieren que el proceso de fisión acaba de finalizar. Por otro lado, en las nLD los parámetros modificados por el AO 400  $\mu\text{M}$  se revirtieron casi totalmente en  $-AO$  (48), ya que si bien se observaron leves diferencias, fueron comparables al control ([Figuras 11A, B y C](#)). Los fenómenos de fisión no son tan evidentes en las nLD en  $-AO$  (48), ya que el número de LD es muy reducido.

Se evaluó la viabilidad celular mediante recuento de células en cámara de Neubauer y se observó que la misma no fue afectada en las siguientes condiciones evaluadas: a) 48 h post tratamiento con AO 400  $\mu\text{M}$ , b) 72 h post tratamiento con AO 400  $\mu\text{M}$  ([Figura 18](#)).



**Figura 17. Fisión de cLD en células HepG2 tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$  e incubadas en ausencia de AO por 48 h y 72 h post tratamiento.** Análisis mediante microscopía de epifluorescencia. En azul se observa la tinción de los núcleos con DAPI y en verde, de las LD con BODIPY 493/503. **A)** Fisión de cLD a las 48 h post tratamiento con AO. **B)** Fisión de cLD a las 72 h post tratamiento con AO. A la derecha se observa una ampliación de la zona enmarcada en la imagen izquierda, en la que se delimitan mediante círculos las gotas que se encuentran participando del proceso de fisión.



**Figura 18. Viabilidad de células HepG2 post tratamiento con AO.** La viabilidad celular se determinó por recuento celular en cámara de Neubauer. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  DS. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de ANOVA seguido del test Posthoc de comparación de medias de Tukey ( $p < 0,05$ ). Control: células incubadas en condiciones control de cultivo; AO 400: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu$ M; - AO (48), - AO (72): células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu$ M e incubadas 48 y 72 h post tratamiento en ausencia del mismo.

### **Hepatocitos**

En hepatocitos los incrementos producidos por el AO 400  $\mu$ M en las nLD se revirtieron cuando el AO fue excluido del medio de cultivo durante 48 o 72 h, ya que en esas condiciones de cultivo, los parámetros morfológicos y la distribución de las poblaciones de nLD fueron semejantes a las del control ([Figuras 16A, B y C](#)), que se caracteriza por estar constituida por una población de nLD mayoritariamente pequeñas (S).

En -AO (48) se observó un importante aumento en el número de cLD que son de menor tamaño (la mediana del diámetro fue de 0,51  $\mu$ m, Max 4,3  $\mu$ m y Vol. 62,8  $\mu$ m<sup>3</sup>) respecto de AO 400 (mediana del diámetro: 1,28  $\mu$ m, Max 5,1  $\mu$ m y Vol. 98,2  $\mu$ m<sup>3</sup>) ([Figuras 15A y 15C](#)), y estos cambios determinaron que en la población de cLD aumentara la proporción de gotas pequeñas (S:51%>M:26%>L:23%) respecto de AO 400 (L:79>M:17%>S:4%) ([Figuras 15B](#)). Por lo tanto, podemos suponer que en -AO (48), parte de las 77 cLD (Max 5,1  $\mu$ m) que había en el citosol por efecto del AO 400  $\mu$ M, se fisionaron y generaron 123 cLD más chicas (Max 4,3  $\mu$ m) ([Figuras 15C](#)). A diferencia de lo observado en células HepG2, en hepatocitos ya a las 48 h post tratamiento con AO se restablecieron parte de las características de las cLD

respecto del control (mediana del diámetro ([Figuras 15A](#)) y distribución de tamaños ([Figuras 15B](#))).

En hepatocitos a las 72 h post tratamiento con AO 400  $\mu\text{M}$ , la población de cLD presentó las características de tamaño (mediana del diámetro 0,51  $\mu\text{m}$  y Max 2,5  $\mu\text{m}$ ) ([Figuras 15A](#)) y de distribución de tamaños (S:54%>M:31%>L:15%) similares a las del control ([Figuras 15B](#)); sin embargo, en el citosol hubo 3 veces más cLD (107) que en el control (31) lo cual determinó que, si bien el volumen (Vol. 54,6  $\mu\text{m}^3$ ) de las cLD se redujo respecto de -AO (48) (62,8  $\mu\text{m}^3$ ), fue mayor al de la condición control (Vol. 15,8  $\mu\text{m}^3$ ) ([Figuras 15C](#)). A diferencia de los hepatocitos, en células HepG2 en -AO (72), el número de cLD fue comparable al de la condición control.

#### **Conclusión (4.4.2.)**

Luego del tratamiento con AO 400  $\mu\text{M}$ , se pudo observar que los efectos del AO en el tamaño de las nLD y cLD se revirtieron.

En células HepG2 los parámetros morfológicos en las LD que habían sido incrementados por efecto del ácido oleico se revirtieron totalmente en ausencia del mismo, por lo que las nLD y cLD a las 72 h post tratamiento adquirieron un fenotipo semejante al del control. Por su parte, en hepatocitos si bien ya a las 48 h post tratamiento la mediana del diámetro y la distribución de tamaños de cLD y nLD recuperaron los valores del control, el número de cLD se mantuvo incrementado, aunque se observó una tendencia de disminución. Por lo tanto, el efecto del AO es reversible con características particulares para cada tipo de LD.

Estos resultados validan la hipótesis: *Las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico, que mediante mecanismos de fusión y de fisión de LD responden a estímulos externos*, y refutan la hipótesis: *Las nLD poseen un metabolismo y regulación diferentes a los de las cLD*. En conclusión:

**Las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico**

**El metabolismo de las nLD está coordinado al de las cLD**



#### 4.4.3. El AO determina modificaciones en el contenido lipídico celular

Habiendo determinado que las cLD y nLD aumentan su número y tamaño en respuesta al tratamiento con AO mediante un mecanismo reversible, el siguiente objetivo fue determinar si el efecto del AO involucra además un aumento en la masa de los componentes de las cLD y nLD. Con este fin se testeó la siguiente hipótesis:

*El AO determina un incremento en los lípidos neutros de las LD*

Con el fin de determinar el contenido de las distintas clases lipídicas en células HepG2, se extrajeron y separaron por TLC los lípidos del homogenato celular obtenido en las distintas condiciones experimentales testeadas.

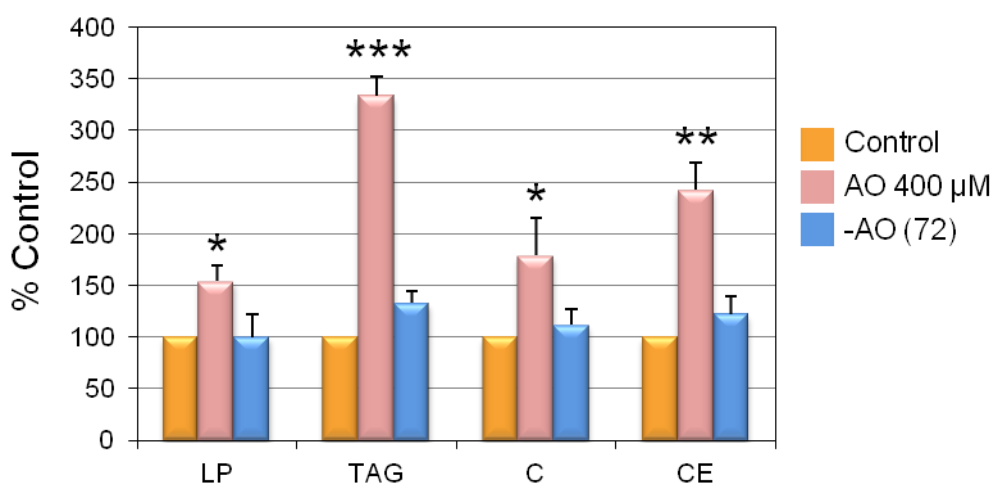
**Tabla 3. Composición de células HepG2**

Composición	Homogenato				
		%	% Total		%
	$\mu\text{g}/10^6\text{ cel}$			$\text{nmol}/10^6\text{ cel}$	
<b>Proteínas</b>	295,1 $\pm$ 20,5		96,2		
<b>Lípidos</b>	11,7 $\pm$ 1,9		3,8		
<b>Lípidos Polares</b>					
GP + SP	5,4 $\pm$ 0,1	46,3	1,8	6,8 $\pm$ 0,1	41,6
<b>Lípidos Neutros</b>	6,3	53,7	2,0	9,6	58,4
TAG	4,3 $\pm$ 1,2	36,8	1,4	5,0 $\pm$ 1,4	30,4
C	1,5 $\pm$ 0,4	12,7	0,5	3,8 $\pm$ 1,0	23,4
CE	0,5 $\pm$ 0,2	4,1	0,2	0,8 $\pm$ 0,3	4,6

En los cálculos solo se consideraron lípidos y proteínas. Los resultados representan la media de al menos 3 experimentos  $\pm$  DS. Se utilizaron los siguientes pesos moleculares: LP: 796; TAG: 864; C: 387; CE: 641. GP: glicerofosfolípidos; SP: esfingolípidos; TAG: triacilglicéridos; C: colesterol; CE: ésteres de colesterol. Lípidos= Lípidos polares + Lípidos neutros.

Como se presenta en la [Tabla 3](#), los lípidos de las células HepG2 están compuestos por LP (46%) y por LN, TAG, C y CE (54%). En las células tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$  el contenido de todas las clases lipídicas se incrementó de manera

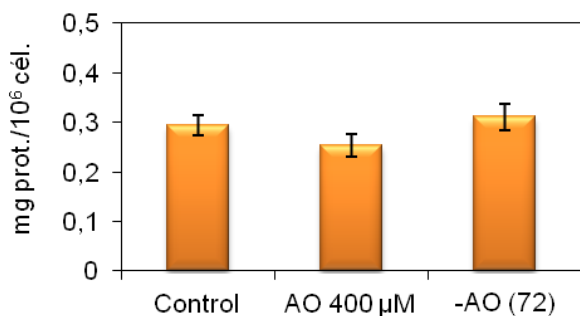
significativa respecto del control, en LP (54,2%) y en los LN: TAG (233,7%), C (78,6%) y CE (142,6%) (Figura 19). En forma contrastante, luego de 72 h de haber eliminado el AO 400  $\mu\text{M}$  (-AO (72)) del medio de incubación, el incremento en los LP y LN producido inicialmente por el AO se revirtió, y el contenido de cada clase lipídica se redujo y fue comparable al del correspondiente control. El contenido de proteínas celulares no se modificó en las condiciones evaluadas como se observa en la Figura 20.



**Figura 19. Composición lipídica de células HepG2.** Los resultados de cada condición (AO 400 y -AO (72)) están expresados como porcentaje de su respectivo control y corresponden a la media de tres determinaciones independientes  $\pm$  DS ( $n=3$ ); \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Se realizaron dos controles (24 h y 96 h de cultivo) cuyos resultados se expresaron como  $\text{nmol} \cdot 10^6 \text{Cell}^{-1}$  como se detalla a continuación:

Control (AO 400  $\mu\text{M}$ ): células cultivadas durante 24 h en condiciones control. Composición lipídica: LP=  $5,3 \pm 0,2$ ; TAG=  $4,9 \pm 0,4$ ; C=  $3,7 \pm 0,3$ ; CE=  $0,7 \pm 0,3$ )

Control (-AO (72h)): células cultivadas durante 96 h en condiciones control. Composición lipídica: LP=  $11,6 \pm 2,1$ ; TAG=  $3,4 \pm 1,9$ ; C=  $12,7 \pm 2,9$ ; CE=  $2,6 \pm 0,4$ .



**Figura 20. Contenido de proteína de células HepG2 tratadas con AO.** Se determinó el contenido de proteínas y el número de células en los cultivos de las diferentes condiciones ensayadas. Los resultados representan la media de al menos 3 experimentos  $\pm$  DS expresados como  $\text{mg prot.} / 10^6 \text{ células}$ .

### **Conclusión (4.4.3.)**

La adición de AO a células HepG2 en cultivo determinó un incremento en el contenido de LP y LN celulares que se revirtió cuando el AO fue excluido del medio de cultivo (-AO).

Los TAG y CE celulares fueron los lípidos que más aumentaron por efecto del AO, y este aumento se reflejó en el mayor número, tamaño y volumen de las LD. Los TAG y CE celulares se localizan mayoritariamente en las LD, mientras que los LP y el C son componentes de todas las membranas celulares, además de estar presentes en la monocapa de las LD. Por lo tanto, los LP y C que aumentaron por el AO no se localizan exclusivamente en la monocapa de las LD, sino que debe haber membranas celulares que también aumentaron su superficie.

### **4.4.4. El efecto del AO involucra la síntesis de lípidos**

Habiendo determinado que las cLD y nLD aumentan su número y tamaño en respuesta al tratamiento con AO mediante un mecanismo reversible que determina un incremento en la masa celular de lípidos, el siguiente objetivo fue determinar si el aumento lipídico por efecto del AO involucra la síntesis de los mismos. Con este fin se testeó la siguiente hipótesis:

*El AO determina un aumento en la síntesis de los lípidos celulares y principalmente de los lípidos de las LD*

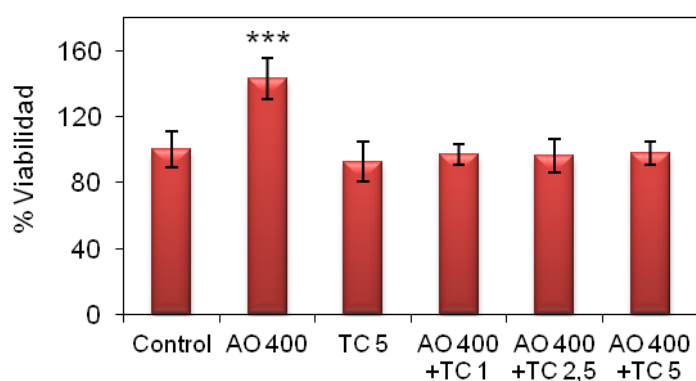
Con el fin de evaluar si la síntesis de LP y LN es indispensable para que aumenten las nLD y cLD por efecto del AO, se eligió como estrategia metodológica el uso del inhibidor de la ACS, el Triacsin C (TC). El TC inhibe la síntesis y el remodelado de LP y LN, al inhibir la formación de los acil-CoA que son indispensables en dicho proceso [117].

### Células HepG2

Con este fin, se incubaron células HepG2 con AO 400  $\mu\text{M}$  en presencia del inhibidor TC con una concentración 5  $\mu\text{M}$  que es la utilizada generalmente en la bibliografía con este fin [118], como se detalla en la [Figura 6](#).

Paralelamente se evaluó la viabilidad celular mediante el método de MTT utilizando concentraciones crecientes de TC (1, 2,5 y 5  $\mu\text{M}$ ) ([Figura 21](#)), y no se observó disminución en la viabilidad celular respecto al control en ninguno de los tratamientos realizados con TC. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la condición AO 400 respecto al control. Este aumento se puede atribuir a que el AO determina que las células se encuentren metabólicamente más activas [107], ya que el número de células se mantuvo constante ([Figura 13](#)).

En estas condiciones, los incrementos producidos por el AO 400  $\mu\text{M}$  en el número, tamaño y volumen de cLD y nLD en células HepG2 se inhibieron, y los parámetros morfológicos de ambas gotas lipídicas fueron semejantes a los de la condición control ([Figura 9](#)). Así mismo, la distribución de tamaños en las poblaciones de ambos tipos de LD fue semejante a la condición control ([Figuras 10B y 11B](#)), ya que no se observaron los aumentos en el número de LD, ni en la mediana del diámetro, el Max y el volumen, antes observados por efecto del AO 400  $\mu\text{M}$  ([Figuras 10A y C, Figuras 11A y C](#)).



**Figura 21. Viabilidad de células HepG2 tratadas con TC.** La viabilidad celular se determinó por el método de MTT. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  DS ( $n=3$ ). Los resultados se compararon respecto a la condición control con: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Control: células cultivadas en condiciones control de cultivo; AO 400: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu\text{M}$ ; AO 400 +TC 1: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu\text{M}$  y TC 1  $\mu\text{M}$ ; AO 400 +TC 2,5: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu\text{M}$  y TC 2,5  $\mu\text{M}$ ; AO 400 +TC 5: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu\text{M}$  y TC 5  $\mu\text{M}$ .

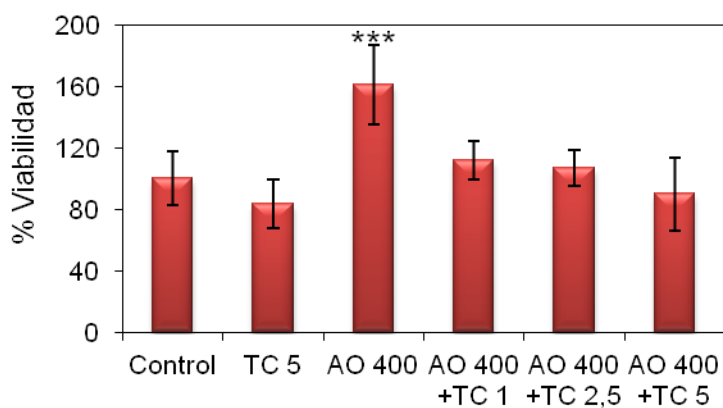
### ***Hepatocitos***

Teniendo en cuenta que los hepatocitos aislados son células muy sensibles a las condiciones de cultivo, inicialmente se evaluó la concentración óptima de TC que inhiba totalmente el efecto del AO 400  $\mu\text{M}$  y que al mismo tiempo no afecte la viabilidad de los mismos.

Con este propósito, se incubaron hepatocitos con AO 400  $\mu\text{M}$  y concentraciones crecientes del inhibidor: 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ .

Para evaluar la viabilidad celular de los hepatocitos sometidos a los tratamientos con TC se realizó el método de MTT. Como se observa en la [Figura 22](#), si bien existe una leve disminución en la viabilidad de las células tratadas con TC 5  $\mu\text{M}$ , no existieron cambios significativos respecto al control en ninguno de los tratamientos realizados con TC. Al igual que lo observado en células HepG2, hubo un aumento significativo en la condición AO 400 respecto al control, que puede atribuirse a la mayor actividad metabólica de las células por efecto del AO [107]. Estos resultados están en concordancia con datos bibliográficos [119].

En hepatocitos tratados con AO 400  $\mu\text{M}$ +TC se observa que el elevado porcentaje de cLD y nLD grandes (L) (característico de dichas poblaciones de LD en células tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$ ) disminuye en función de la concentración de TC agregada al medio ([Figuras 15B y 16B](#)), alcanzando en células tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$ +TC 5  $\mu\text{M}$  una distribución de tamaños de cLD y nLD semejante a la de las células control, que se caracterizan por estar constituidas mayoritariamente por cLD y nLD pequeñas (S). El resto de los parámetros analizados en cLD y nLD también se normalizan en función de la concentración de TC alcanzando los valores del control en células tratadas con AO 400  $\mu\text{M}$ +TC 5  $\mu\text{M}$  ([Figuras 15A y 16A](#), y [Figuras 15C y 16C](#)).



**Figura 22. Viabilidad de hepatocitos aislados tratados con TC.** La viabilidad celular se determinó por el método de MTT. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  DS (n=3). Los resultados se compararon respecto a la condición control con: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Control: células sin tratamiento; AO 400: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu$ M; AO 400 +TC 1: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu$ M y TC 1  $\mu$ M; AO 400 +TC 2,5: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu$ M y TC 2,5  $\mu$ M; AO 400 +TC 5: células tratadas por 24 h con AO 400  $\mu$ M y TC 5  $\mu$ M.

#### Conclusión (4.4.4.)

El AO induce un aumento en las cLD y nLD que requiere de la síntesis de lípidos que se localizarán en las LD determinando el fenotipo característico de las células tratadas con AO.

El AO induce a las cLD y nLD mediante un proceso dinámico, reversible y coordinado.

## 4.5. DISCUSIÓN

### Hipótesis

- 5) *Las gotas lipídicas nucleares constituyen un nuevo dominio nuclear metabólicamente activo, donde se concentran los LN (C, CE y TAG) en un core hidrofóbico rodeados por una monocapa lipoproteica.*
- 6) *Las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico, que mediante mecanismos de fusión y de fisión de LD responden a estímulos externos.*
- 7) Las nLD poseen un metabolismo y regulación diferentes a los de las cLD.

### LD celulares: nLD y cLD

Las LD constituyen un organoide celular donde se almacenan y compartimentalizan principalmente los LN celulares, que se localizan mayoritariamente en el citosol, en las cLD (y en menor proporción dentro del ER en las ILD del lumen), y en el núcleo, en las nLD (solo el 7-9% del total de LD celular (cLD+nLD)).

El metabolismo y/o la génesis de las LD están regulados y determinan que la población de LD posea un fenotipo característico y propio de cada tipo celular. Los estudios de este trabajo se realizaron en un modelo experimental hepático, que incluyó el cultivo primario de hepatocitos de rata y el cultivo de células HepG2 correspondiente a un hepatocarcinoma humano. Ambos tipos celulares poseen poblaciones de LD con características propias, ya que en hepatocitos la mayor proporción de LD (nLD y cLD) posee un tamaño pequeño (S: diámetros menores o iguales a 0,51  $\mu\text{m}$ ), en tanto que en células HepG2 la mayoría de las LD son medianas (M: diámetros mayores a 0,51  $\mu\text{m}$  y menores o iguales a 0,77  $\mu\text{m}$ ).

En el tejido adiposo el tipo de diferenciación celular determina las características de las poblaciones de LD a través de la regulación de su metabolismo. El tejido adiposo blanco está totalmente diferenciado, y los TAG se organizan en una única cLD gigante (que ocupa casi todo el citoplasma de la célula) con poca actividad metabólica. El tejido adiposo pardo (BAT) posee un activo

catabolismo de FA, y las cLD resultantes de este tejido son mucho más pequeñas que las del blanco. Un caso intermedio lo constituye el tejido adiposo blanco cuando sufre el proceso de “amarronado” (browning) que se caracteriza por una activación en el catabolismo de los FA y un aumento en el número de cLD que poseen menor tamaño que la única del adiposo original [120]. En términos generales, se postula que el tamaño de las cLD es inversamente proporcional a la actividad metabólica de las mismas [120], por lo tanto, teniendo en cuenta que las nLD son más pequeñas que las cLD ( $nLD_{Max} < cLD_{Max}$ ), podemos suponer que dentro del núcleo el metabolismo de los LN sería más activo que en el citosol. Siguiendo con el mismo razonamiento, los hepatocitos tendrían un metabolismo lipídico más activo que las células HepG2 ya que poseen mayor número de nLD y cLD, y estas son mayoritariamente de menor tamaño.

### **Composición química y organización estructural de las LD**

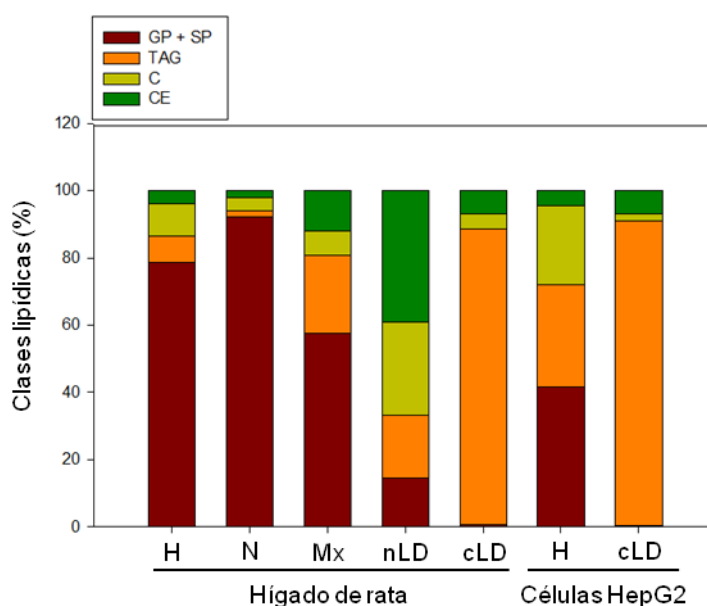
En este trabajo, se determinó la composición química de las cLD de células HepG2 y no se pudo determinar la de las nLD ya que la sensibilidad de las determinaciones bioquímicas no lo permite. Para poder determinar la composición química de las nLD, inicialmente se deberían aislar los núcleos de las células en cultivo, luego aislar las nLD de los núcleos y finalmente hacer las determinaciones bioquímicas respectivas. Debido a que los rendimientos finales luego de todo el proceso serían demasiado bajos, no es posible en la actualidad realizar dichas determinaciones. Tampoco se pudieron realizar las determinaciones de composición de nLD y cLD provenientes de hepatocitos en cultivo primario ya que los mismos se cultivan en cantidades reducidas, y para realizar las determinaciones se requiere una mayor cantidad de células. Consideramos que la composición del cultivo primario de hepatocitos sería equivalente a las realizadas previamente en el laboratorio a partir de nLD y cLD aisladas de núcleos y homogenato de hígado de rata, respectivamente [18].

La composición química de las cLD (banda A) de células HepG2 es equivalente a los datos determinados previamente en el laboratorio para cLD aisladas de homogenato de hígado de rata [18] y a los datos de bibliografía [115]. Las cLD están compuestas mayoritariamente por lípidos (78%) y una baja



proporción de proteínas (22%), entre los lípidos >99% son LN y solo <1% son LP. En particular, el perfil de LN es el siguiente: TAG (93%), C (1%) y CE (5%). Teniendo en cuenta que las células HepG2 corresponden a una línea celular de hepatocarcinoma humano, podemos considerar que la composición de las cLD hepáticas estaría conservada evolutivamente en el hígado humano y de rata.

En trabajos previos del laboratorio se determinó que en hígado de rata las nLD están constituidas por las mismas clases lipídicas que las cLD pero con una composición relativa diferente, ya que las nLD están constituidas por un 38% de lípidos y un 62% de proteínas. Los lípidos y proteínas de las nLD representan tan solo el 0,002% de los respectivos componentes celulares, y esto determina que las nLD correspondan al 5% de las LD totales (nLD+cLD) [18]. Los lípidos de las nLD de hígado de rata están formados en un 85% por LN y un 15% por LP. Las nLD poseen una composición particular de LN rica en CE (45%), C (32%) y TAG (23%), que es muy diferente de la observada en homogenato total de hígado, núcleo entero, matriz nuclear y cLD aisladas de homogenato [18], así como también de las cLD aisladas de células HepG2, en la que los lípidos mayoritarios son los TAG (Figura 23).



**Figura 23. Composición lipídica comparativa de fracciones celulares de hígado de rata y células HepG2.** Los datos presentados se calcularon a partir de los resultados de las Tablas 1 y 3 (muestras provenientes de células HepG2 ( $\text{nmol} \cdot 10^6 \text{células}^{-1}$ )) y de resultados previos de laboratorio (muestras de hígado de rata ( $\text{nmol} \cdot \text{g hígado}^{-1}$ )) [18]. Las clases lipídicas se graficaron como un porcentaje del total. Muestras de hígado de rata: H, homogenato; N, núcleo; Mx, matriz nuclear; nLD, gotas lipídicas nucleares; cLD, gotas lipídicas citosólicas. Muestras de células HepG2: H, homogenato celular; cLD, gotas lipídicas citosólicas.

Los TAG del core de ambas LD en hígado de rata (nLD y cLD), están compuestos por porcentajes equivalentes de FA saturados (30-37%), FA monoinsaturados (MUFA) y PUFA. Los MUFA y PUFA de las series n-9 (30-32%) y n-6 (26-33%), respectivamente, son los insaturados más abundantes. Los principales FA esterificados a TAG son: el ácido oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6), y en menor proporción el ácido palmítico (16:0).

Las nLD y las cLD están organizadas en un core hidrofóbico de TAG y CE rodeado por una monocapa de LP, C y proteínas asociadas (*Sección 2.4.1. Estructura y caracterización* (Introducción)). En las LD la organización supramolecular de la monocapa está muy conservada, ya que la proporción relativa de sus componentes, proteínas, C y LP, es semejante en cLD de células HepG2 (determinado en este trabajo), y en nLD y cLD de hígado de rata [18], lo que sugeriría que esta composición sería indispensable para la estabilidad termodinámica de la monocapa. Si bien las proteínas constituyen el componente mayoritario de la monocapa en ambos tipos de LD (nLD y cLD), resulta interesante resaltar que existirían diferencias cualitativas en las proteínas de las cLD y las nLD, al menos en lo que respecta a las proteínas de la familia PAT, ya que PLIN1 (perilipina 1) que es la proteína mayoritaria de las cLD no estaría presente en las nLD de hígado de rata [18]. Más aun, está documentado que dentro de una misma población celular existe heterogeneidad en la composición proteica de las cLD [107]. En el caso particular de las nLD, al tener un menor tamaño que las cLD, la población de nLD posee mayor proporción de monocapa que las cLD ya que se necesita una mayor área para poder recubrir un core hidrofóbico más pequeño [18].

En el cultivo de células HepG2 fue posible establecer la relación estequiométrica de los componentes de la monocapa y el core en las cLD. En la monocapa por cada molécula de LP habría 4 moléculas de C, y en el core se ubicarían 13 moléculas de TAG por cada molécula de CE. La estequiometría propuesta para la monocapa sería la misma en las cLD y nLD de hígado de rata, ya que presentan la misma proporción de componentes. Teniendo en cuenta que la proporción de componentes del core de cLD de hígado de rata es semejante a las cLD de células HepG2, podríamos proponer que poseen la misma estequiometría entre TAG y CE (13:1).

En el core de las nLD la relación estequiométrica entre los TAG y CE probablemente sea diferente, ya que la proporción de los componentes es diferente.

Según nuestro conocimiento, estos son los primeros datos experimentales a partir de los cuales se propone una estequiometría de la monocapa de las nLD y cLD, y el core de las cLD. En estos cálculos, no se tuvo en cuenta a las proteínas ya que por el momento resulta imposible determinar los moles de las mismas en la monocapa de las LD.

### **Las nLD son un dominio nuclear dinámico**

En este trabajo hemos demostrado que las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico cuyas características morfológicas y composición lipídica responden en forma reversible a estímulos externos, como el ácido oleico. Estos resultados implican que las nLD estarían participando activamente en procesos que se desarrollan dentro del núcleo. Ya está descrito que otros dominios nucleares (*NB: nuclear bodies*) como los *speckles*, *paraspeckles*, corpúsculos de Cajal, etc., también son dinámicos, y responden modificando su número y tamaño a lo largo del ciclo celular, en respuesta a estímulos, etc. Sin embargo las nLD constituyen el único dominio nuclear dinámico rodeado por una monocapa, y por lo tanto, el aumento de tamaño de las nLD no se restringe a un reclutamiento de moléculas, como se propone que ocurre con otros dominios nucleares en respuesta a determinados estímulos [16], sino que es un proceso complejo y muy regulado como se detalla a continuación. Por lo tanto, en el hígado las nLD al igual que las cLD, son organoides celulares dinámicos.

El AO determinó un aumento en el tamaño de las nLD y cLD indicando que existe una coordinación en el metabolismo de ambas LD (cLD y nLD) ya que las poblaciones resultantes por efecto del tratamiento (AO 400) están constituidas mayoritariamente por LD grandes (nLD y cLD con diámetros mayores a 0,77  $\mu\text{m}$ ) tanto en hepatocitos como en células HepG2.

Podemos suponer que el aumento en el tamaño de las LD involucró uno o más de los siguientes mecanismos:

- 1) *Aumento de tamaño por incorporación de contenido: las LD aumentaron de tamaño debido a un incremento de los lípidos que las constituyen, principalmente un importante aumento en los lípidos del core (TAG y CE).*
- 2) *LD generadas de novo: las cLD se generarían en el citosol (ER), y las nLD, en la MNI del núcleo, o bien ingresarían por el complejo del poro nuclear desde el citosol.*
- 3) *Fusión de LD: en este trabajo se demostró por primera vez que existe fusión de LD en el núcleo celular. Estos datos confirman el mecanismo propuesto en bibliografía para describir el efecto del AO en las cLD [60]. Por otro lado, podemos suponer que la fusión de LD es un mecanismo generalizado, descrito tanto en el núcleo como en el citosol de células del dominio Eukarya, como así también en organismos del dominio Bacteria, ya que las bacterias *Rhodococcus* poseen cLD en su citoplasma que responden a estímulos internos y externos modificando su número y tamaño por mecanismos de fusión [121], [122].*

Es interesante resaltar que el efecto del AO sobre las nLD y cLD incluiría combinaciones de estos mecanismos, ya que ninguno por sí solo puede explicar todos los eventos que se desarrollan.

En ambos tipos celulares, las modificaciones morfológicas en las nLD fueron de menor magnitud que en las de cLD. Este hecho puede deberse a limitaciones espaciales y/o por menor disponibilidad de los componentes de las nLD dentro del núcleo.

Por otro lado, podemos suponer que en hepatocitos el metabolismo de las nLD y cLD está más regulado que en células HepG2, ya que si bien ambos tipos de LD aumentan dramáticamente por efecto del AO, las LD más grandes (Max) en hepatocitos poseen menor tamaño a las observadas en células HepG2.

En el hígado, PPAR $\alpha$  promueve la oxidación de FA en las mitocondrias y en los peroxisomas [123]. Se ha observado que por efecto del AO aumenta la expresión de PPAR $\alpha$  [124], previniendo la esteatosis inducida por AO.

La dramática inducción de las nLD y cLD en respuesta al AO externo en ambos tipos celulares es un evento reversible que tiende a restablecerse paulatinamente en función del tiempo, e involucra los siguientes mecanismos:

- 1) *Disminución de tamaño por reducción del contenido: las LD disminuyeron de tamaño debido a una reducción de los lípidos que las constituyen, principalmente de los lípidos neutros del core, por aumento de las rutas catabólicas. Podemos suponer que hubo un aumento en la lipólisis de los lípidos de las LD que se movilizaron a los sitios de oxidación en el citosol. En particular, en el proceso de lipólisis nuclear podría estar participando una DAG lipasa y una MAG lipasa, que han sido ya descritas en el núcleo celular [42]. Los ácidos grasos liberados se unirían a la FABP nuclear, ya que está demostrado que la FABP tiene un activo rol en la movilización de los FA en la matriz nuclear, para ser movilizados a posibles sitios de oxidación nuclear y/o citosólicos.*
- 2) *Fisión de LD: este mecanismo determinó que aumentara el número de LD más pequeñas. Prácticamente no existe bibliografía en relación a los mecanismos moleculares involucrados en este proceso, y se propone que las perilipinas participarían en la fisión de las cLD.*

Existiría una coordinación en el metabolismo de los LN entre el núcleo y el citosol que se refleja en los mismos cambios morfológicos observados en las nLD y cLD.

Podemos suponer que en hepatocitos el metabolismo de las nLD y cLD está más regulado y es más activo que en células HepG2, ya que los cambios morfológicos de las LD por efecto del AO se revirtieron en menor tiempo.

## Resumen

El AO induce en forma coordinada y reversible a las nLD y cLD mediante un mecanismo que involucra la síntesis de LP y LN que se localizan en las LD y determinan el aumento de tamaño observado. En este mecanismo participa la Acil-CoA sintetasa, ya que si se inhibe la actividad de la enzima, dichos incrementos no se producen.

Las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico, y coordinado con las cLD, cuyas características morfológicas se modifican en forma reversible por el AO, mediante mecanismos que involucran síntesis y degradación de los lípidos que las constituyen, y fusión y fisión de LD.

El cultivo primario de hepatocitos de rata es un modelo experimental hepático en el que el metabolismo lipídico estaría más regulado que el de las células HepG2, y por lo tanto, los cambios observados por efecto del AO son más acotados. Hemos propuesto que el metabolismo de los hepatocitos es más activo que el de las células HepG2, lo que permitiría explicar la reversión más rápida hacia el fenotipo control una vez eliminado el AO. Si bien en ambos tipos celulares el AO determina que la población mayoritaria de nLD y cLD sea grande (L), la LD más grande (Max) en las nLD y cLD de hepatocitos es menor respecto de las de células HepG2, ya que la variación de tamaño estaría más acotada. En los hepatocitos, esta restricción en el tamaño máximo de las nLD y cLD determina que la mayor masa de LN sintetizada por efecto del AO se distribuya en muchas gotas “no tan grandes” (menor Max), y eso explicaría el mayor número de gotas observado.

## Capítulo II

# *Proteómica de las nLD*

## Objetivos

- 1- Seleccionar una proteína como marcadora de las nLD que permita identificarlas.
- 2- Determinar si existen proteínas del metabolismo lipídico en las nLD.

## Hipótesis

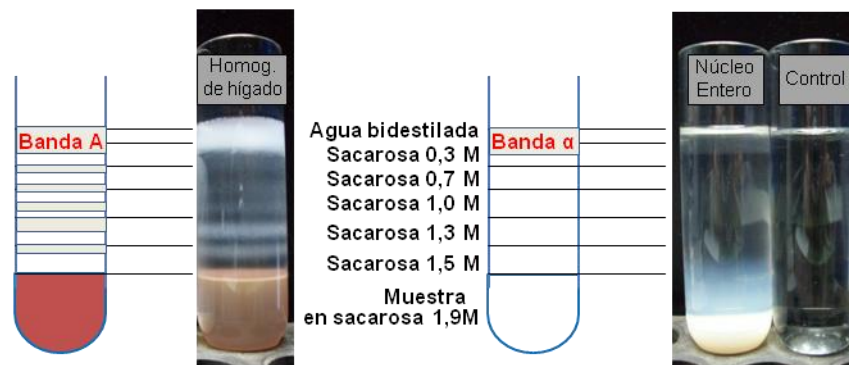
- 1) *Las proteínas de la monocapa de las nLD están involucradas en el metabolismo lipídico y en los sistemas de transducción de señales nucleares. Ya sea como componentes estructurales, enzimas, factores de transcripción y/o proteínas de transporte.*



### 5.1. AISLAMIENTO DE nLD DE NÚCLEOS CELULARES DE HÍGADO DE RATA

Las nLD se aislaron de núcleos enteros adaptando el protocolo estándar de aislamiento de las cLD que se basa en la separación de las mismas mediante un gradiente de sacarosa [18]. Como control de la técnica implementada, se aislaron en forma paralela cLD a partir de homogenato de hígado de rata. En la muestra de homogenato de hígado se separaron 6 bandas de diferente densidad. De acuerdo a Ontko et al. [115] cada banda posee una composición característica tanto lipídica como proteica.

Luego de la centrifugación de la muestra de núcleos, en el gradiente se observó una sola banda clara y blanca en la parte superior del tubo, a la cual denominamos banda  $\alpha$ , que es dónde se encuentran las nLD, y posee características macroscópicas análogas a las de la banda A del homogenato de hígado (Figura 24). La sonicación de los núcleos fue la técnica más apropiada para poder homogeneizarlos y lograr un mayor rendimiento de nLD, ya que utilizando un homogeneizador de tejidos vidrio-vidrio o vidrio-teflón la banda  $\alpha$  que se obtenía en el gradiente era muy tenue, y la mayor proporción de la muestra quedaba retenida en el pellet blanco de núcleos enteros en el fondo del tubo de centrifuga.



**Figura 24. Aislamiento de gotas lipídicas de hígado de rata.** Las fotos corresponden a tubos de centrifuga cargados con muestras de homogenato de hígado de rata, núcleo entero, y un control sin muestra, luego de 30 minutos de centrifugación del gradiente discontinuo de sacarosa. A la izquierda de las fotografías se presentan esquemas de los tubos con la ubicación de las bandas observadas en el gradiente.

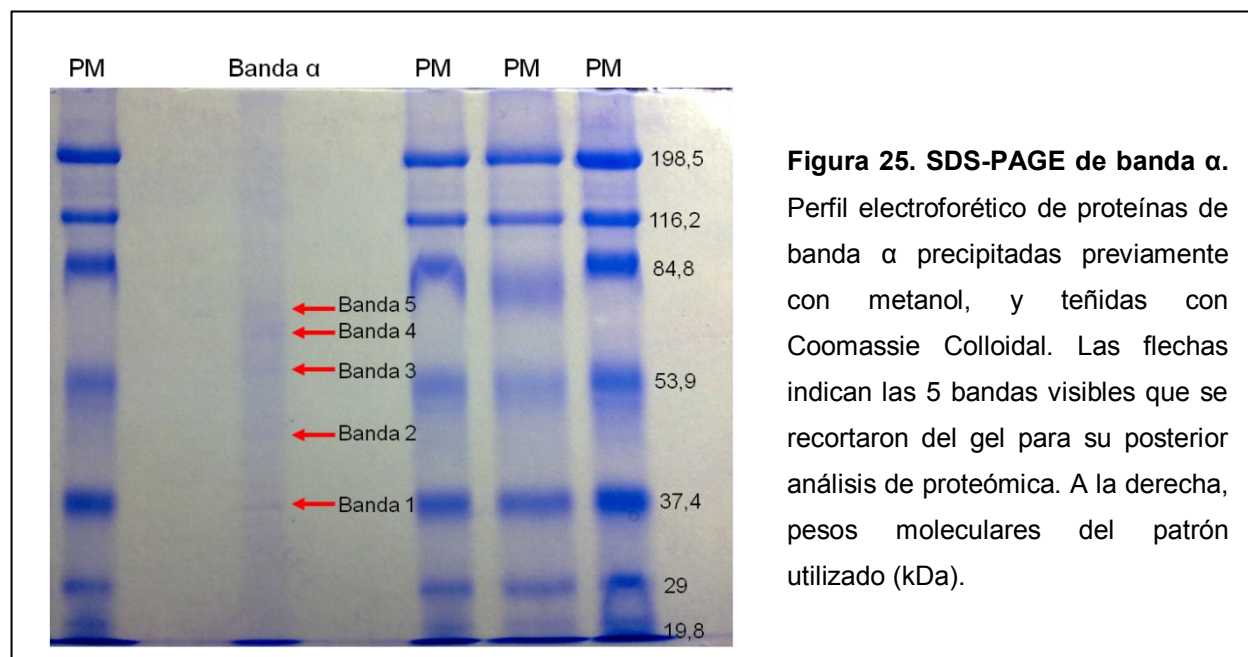
## 5.2. ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO DE LAS nLD

Con el objetivo de identificar una proteína como marcadora de las nLD, en una primera etapa se estudió el perfil proteico de las mismas utilizando distintas metodologías que se detallan a continuación.

### 5.2.1. 1-D Electroforesis (SDS-PAGE)

La caracterización de las proteínas presentes en las nLD se abordó inicialmente mediante técnicas clásicas de SDS-PAGE. Antes de sembrar la muestra en el gel, las proteínas de la banda  $\alpha$  se concentraron mediante precipitación con metanol, etanol, o acetona. El metanol fue el solvente con el que se obtuvo una mayor recuperación y por lo tanto fue el adoptado.

Las proteínas del gel se colorearon mediante tinción con Coomassie coloidal (G-250), y fue posible observar la presencia de bandas proteicas, aunque las mismas se vieron algo tenues (Figura 25). Según datos bibliográficos, con esta coloración se pueden observar bandas con una concentración proteica mayor a 30 ng por banda [125].

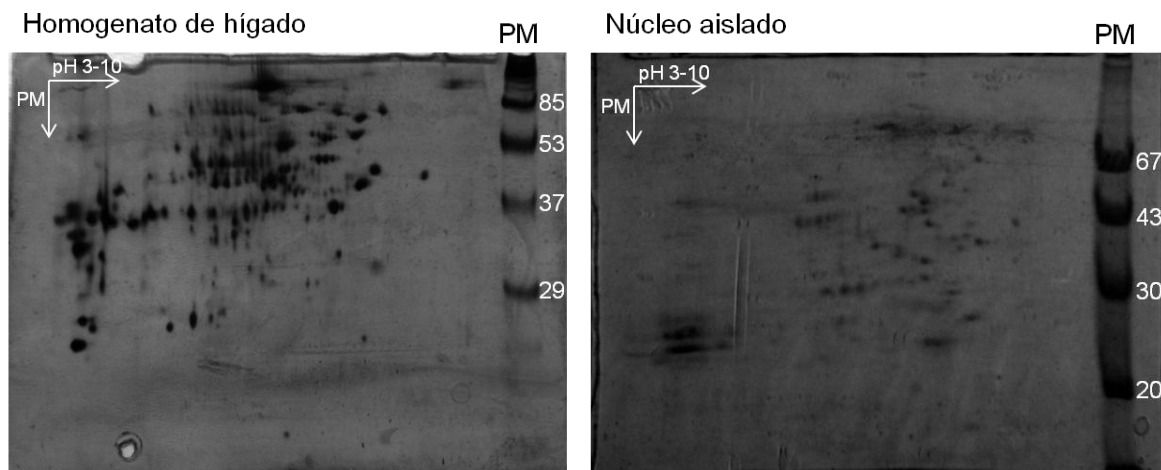


### 5.2.2. 2-D Electroforesis

Con el objetivo de realizar un análisis más exhaustivo de las proteínas presentes en las nLD se decidió utilizar la técnica de separación de proteínas mediante electroforesis en dos dimensiones.

La técnica inicialmente se optimizó utilizando homogenato de hígado de rata, que es una muestra que posee una gran cantidad de proteínas. Posteriormente se procedió al análisis de muestras de núcleos aislados, ya que las proteínas presentes en las nLD también deberían estar en el núcleo.

En la primera dimensión de la electroforesis las proteínas de la muestra se separaron mediante isoelectroenfoque (IEF) en función de su punto isoeléctrico (pI). Se utilizaron tiras comerciales con un rango amplio de pH: 3-10, dado que se desconocía la naturaleza de las proteínas presentes en la muestra. Una vez finalizada la misma, las tiras se equilibraron inicialmente con un buffer en presencia de DTT, este paso permite la escisión de los puentes di-sulfuro por reducción; y posteriormente se colocaron en un buffer con Iodoacetamida (IAA) de manera de alquilar los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína (Cys).



**Figura 26. 2-D Electroforesis de homogenato de hígado y núcleo aislado.** Las proteínas se separaron en la primera dimensión usando tiras de pH 3-10, y luego en un SDS-PAGE al 10%. Los gels se tiñeron con plata. Los patrones de peso molecular se muestran a la derecha (kDa). **A)** Homogenato de hígado de rata. **B)** Núcleo aislado.

En la segunda dimensión de la electroforesis, las proteínas se separaron respecto a sus masas moleculares en un SDS-PAGE. Los geles se revelaron por tinción con plata, ya que es una técnica sensible que permite detectar spots donde la cantidad de proteínas es baja (5-10 ng) [126].

Con las condiciones ensayadas se obtuvieron geles bien resueltos, con una gran cantidad de spots, separados y definidos, como se muestra en la [Figura 26](#).

Sin embargo, cuando se aplicaron estas mismas condiciones experimentales para la separación de las proteínas de las nLD no se pudieron visualizar spots proteicos en los geles.

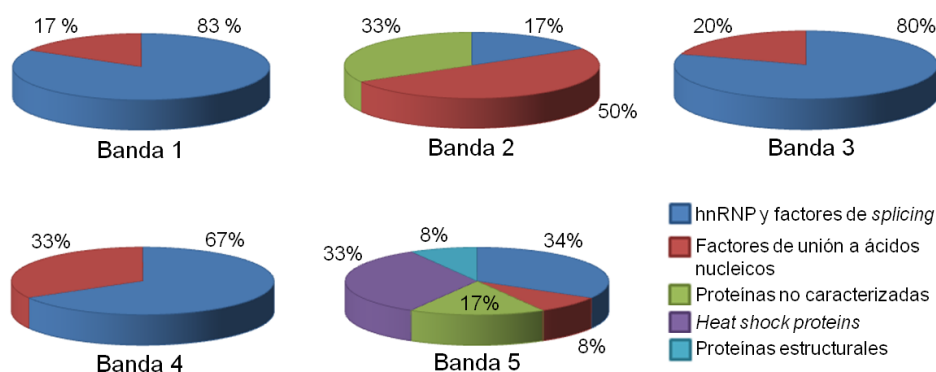
### 5.2.3. Identificación de proteínas por PMF MALDI-TOF MS

Con el fin de identificar las proteínas presentes en las nLD, y teniendo en cuenta que la técnica de 2-D electroforesis no fue la adecuada, se realizó un estudio por MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*). Esta es una técnica ampliamente utilizada en el campo de la proteómica [127].

Inicialmente, las proteínas de la banda  $\alpha$  se resolvieron por SDS-PAGE, y se colorearon mediante tinción con Coomassie coloidal (G-250).

Las 5 bandas mayoritarias se recortaron del gel y se analizaron por MALDI-TOF MS mediante un servicio a terceros de proteómica en España ([Figura 25](#)).

Con el fin de identificar las proteínas presentes en las nLD, los datos obtenidos mediante el análisis de huella peptídica por MALDI-TOF MS (*peptide mass fingerprinting by* MALDI-TOF MS, PMF MALDI-TOF MS) fueron analizados con el motor de búsqueda en bases de datos MASCOT. De esta forma, se obtuvo un listado de proteínas para cada una de las bandas analizadas. Las proteínas se clasificaron en diferentes grupos en base a un análisis funcional de las mismas ([Figura 27](#)).



**Figura 27. Clasificación funcional de las proteínas de banda  $\alpha$  identificadas por MALDI-TOF MS.** Las proteínas identificadas por MALDI-TOF MS provenientes de las 5 bandas mayoritarias del gel (**Figura 25**) fueron clasificadas en base a sus características funcionales en 5 categorías.

Las listas de proteínas obtenidas de cada banda del gel estaban constituidas en su mayoría por proteínas propias del núcleo, como ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP), factores de unión a ácidos nucleicos, y *heat shock proteins* (HSP). No se puede descartar la posibilidad de que estas proteínas no sean exclusivas de las nLD y se encuentren en otros dominios nucleares.

Por lo tanto resultó imposible cumplir con uno de los objetivos de este trabajo, que era encontrar una proteína marcadora de las nLD. Llamó la atención no haber encontrado ninguna proteína característica de las gotas lipídicas, ya sean proteínas estructurales de la familia PAT o del metabolismo lipídico, involucradas en procesos anabólicos, catabólicos y/o de la movilización de los mismos, como ha sido ampliamente descrito en las cLD. Es importante destacar que solo se analizaron las bandas cuantitativamente mayoritarias del gel, y es posible que la proteína marcadora y/o las involucradas en el metabolismo lipídico de las nLD sean proteínas minoritarias, y por lo tanto correspondan a zonas del gel que no se analizaron.

## Conclusión (5.2.)

La metodología MALDI-TOF MS no resultó ser la adecuada para realizar un estudio de proteómica a partir de una muestra cruda de nLD (banda  $\alpha$ ).

El estudio de las proteínas de las nLD es complejo, ya que: 1) se encuentran en muy baja cantidad (solo constituyen el 0,0004% de las proteínas celulares [18]) y por lo tanto, es necesario repetir los procedimientos de obtención sucesivamente

para disponer de una cantidad adecuada de muestra de partida (banda  $\alpha$ ), 2) el 85% de los lípidos que las conforman son neutros [18] y como tales, dificultan los procesos de purificación en medios acuosos, 3) las nLD se aíslan de hígado de rata mediante un protocolo experimental con numerosas y variadas etapas, 4) la muestra de partida presenta una serie de interferentes que impiden el uso directo de la misma en un análisis de proteómica. Por lo tanto, es necesario eliminar los interferentes y enriquecer en proteínas la muestra de nLD previo a su análisis.

### 5.3. PROTEÓMICA DE LAS nLD MEDIANTE GeLC-MS

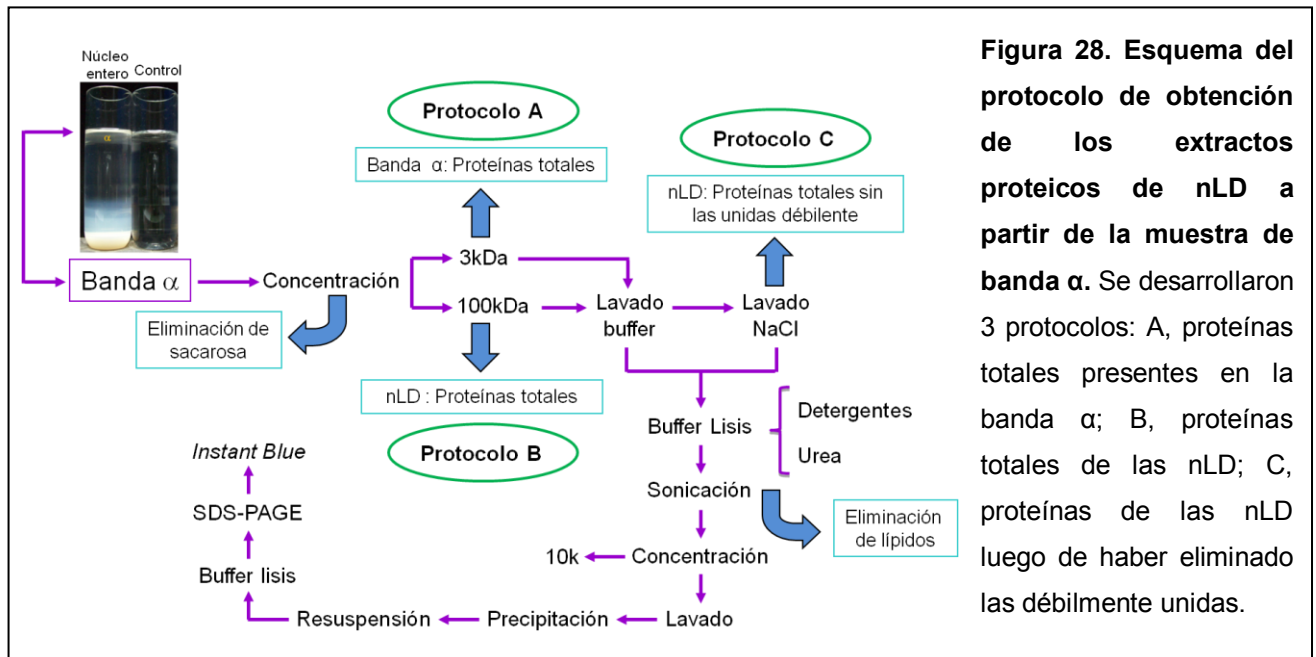
Dado que las nLD corresponden a una muestra compleja con una muy baja cantidad de proteínas, los siguientes objetivos fueron:

- 1) Diseñar un protocolo experimental que permitiera enriquecer la muestra en proteínas y disminuir los interferentes.
- 2) Determinar el subproteoma de las nLD mediante la técnica GeLC-MS (digestión triptica *in-gel* seguida por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas). GeLC-MS [128] es una técnica de identificación masiva utilizada para el análisis de proteínas de muestras complejas, que permite analizar la totalidad de una muestra proteica sembrada en una calle completa del gel.

#### 5.3.1. Protocolo de obtención del extracto proteico de nLD

Como ya se indicó previamente, uno de los principales interferentes presentes en la muestra son los lípidos neutros de las nLD. La sacarosa constituye otro interferente, y proviene de los gradientes utilizados en los protocolos de obtención de los núcleos y de la banda  $\alpha$ . La sacarosa puede estar presente en trazas en la muestra cruda, pero se hace relevante al concentrar la muestra. Inicialmente, previo a los estudios de 2-D electroforesis se intentó concentrar la banda  $\alpha$  cruda por liofilización, pero se observó que la muestra se “caramelizaba” y ya no era posible continuar con su análisis (resultados no presentados en este trabajo).

Finalmente, las proteínas de la banda  $\alpha$  se concentraron utilizando tres protocolos diferentes (A, B y C) que se detallan en la [Figura 28](#). El extracto obtenido mediante el protocolo A, corresponde a las proteínas totales de la banda  $\alpha$ ; el B, a las proteínas totales de las nLD; y el extracto obtenido mediante el protocolo C corresponde a las proteínas presentes en las nLD a las que se les eliminaron las unidas débilmente mediante el tratamiento con NaCl.



**Figura 28. Esquema del protocolo de obtención de los extractos proteicos de nLD a partir de la muestra de banda  $\alpha$ .** Se desarrollaron 3 protocolos: A, proteínas totales presentes en la banda  $\alpha$ ; B, proteínas totales de las nLD; C, proteínas de las nLD luego de haber eliminado las débilmente unidas.

Los protocolos incluyeron las siguientes etapas:

### Concentración

La banda  $\alpha$  se concentró en proteínas mediante filtración de la muestra cruda. Se utilizaron filtros con los siguientes tamaños de poro:

- Filtro 3 kDa: la muestra conservó gran parte de las proteínas presentes en la banda  $\alpha$ , ya que se retuvieron todas aquellas proteínas con un peso molecular superior a 3 kDa.
- Filtro 100 kDa: se retuvieron las nLD junto con las proteínas que se encontraban unidas y/o interaccionando con las mismas. Se eliminaron aquellas proteínas presentes en la banda  $\alpha$ , no unidas a las nLD y con un peso molecular inferior a 100 kDa.

### *Lavado*

La muestra filtrada se lavó reiteradas veces a fin de eliminar la sacarosa presente y, en algunos casos, de eliminar aquellas proteínas unidas mediante interacciones débiles (NaCl):

- Con buffer: la muestra retenida en el filtro se lavó con buffer, y con la posterior concentración de las proteínas se eliminó la sacarosa.
- Con solución de alta fuerza iónica: la muestra retenida en el filtro se lavó con una solución de NaCl concentrada, de manera de romper las interacciones débiles de las proteínas entre sí y/o con los componentes de la monocapa de las nLD. Las proteínas liberadas fueron eliminadas posteriormente mediante la concentración por filtración.

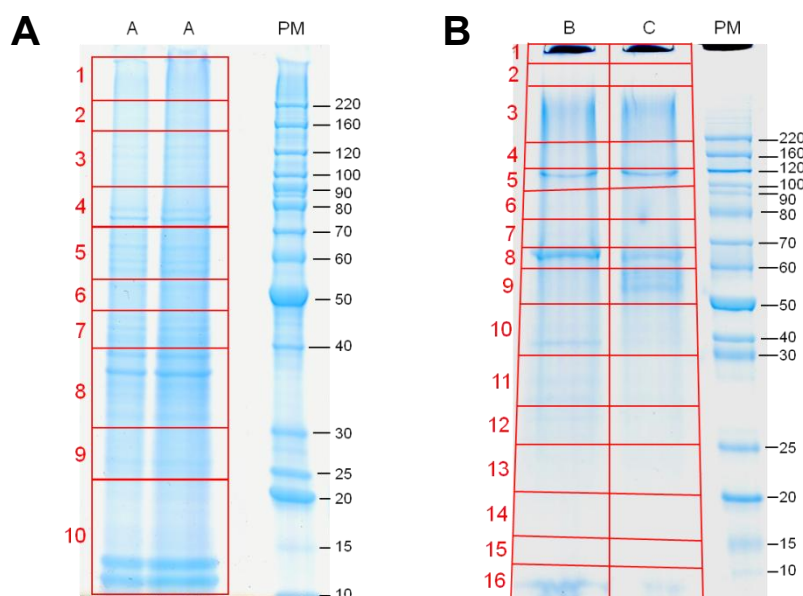
### *Desnaturalización de las proteínas y eliminación de lípidos*

En todos los protocolos ensayados la muestra se trató con un buffer de lisis conteniendo urea (agente caotrópico desnaturalizante), y detergentes no iónicos, a fin de eliminar los lípidos presentes en la misma. Los detergentes forman micelas solubles lípido-detergente. Mediante una etapa de sonicación se redujo el tamaño de las micelas, y finalmente estas se eliminaron de la muestra proteica mediante concentración por filtración.

### *SDS-PAGE*

Los extractos proteicos obtenidos mediante los tres protocolos ensayados (A, B y C) se resolvieron por SDS-PAGE, y las proteínas se colorearon mediante la técnica de Coomassie coloidal ([Figura 29](#)). En una primera instancia se realizó un SDS-PAGE donde se sembraron dos concentraciones del extracto proteico A. En una segunda corrida electroforética se sembraron los extractos proteicos B y C. Se obtuvieron geles bien resueltos donde se pudo observar la presencia de bandas definidas.





**Figura 29. SDS-PAGE de los extractos proteicos de nLD obtenidos a partir de la muestra de banda  $\alpha$ .** Perfil proteico de los extractos obtenidos mediante los protocolos A, B y C. Las proteínas de cada gel se tiñeron utilizando el colorante Coomassie coloidal. Los patrones de peso molecular (PM) se muestran a la derecha en ambos geles (kDa). Los geles se cortaron en 10 (protocolo A) y 16 trozos (protocolos B y C) para su posterior análisis. **A)** Extracto proteico obtenido mediante el protocolo A (proteínas totales de banda  $\alpha$ ). La siembra se realizó por duplicado. **B)** Extractos proteicos obtenidos mediante los protocolos B (proteínas totales de las nLD) y C (proteínas de las nLD sin las unidas débilmente).

### 5.3.2. GeLC-MS

El estudio de la proteómica de cada una de las muestras se abordó mediante la técnica GeLC-MS, de manera de poder analizar la totalidad de las proteínas presentes en cada muestra.

En el protocolo realizado, la calle del gel correspondiente al extracto proteico obtenido mediante el protocolo A se cortó en 10 trozos, en tanto que las calles de B y C se cortaron en 16 trozos (Figura 29). Cada porción del gel se sometió luego a una digestión trípica *in-gel*. La eficiencia de la digestión trípica de cada una de las muestras se verificó mediante análisis por MALDI-TOF MS.

Los péptidos resultantes de la digestión se analizaron por cromatografía nano-HPLC acoplada a espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS) por trampa iónica (nLC-ESI). La técnica de análisis por nLC-ESI es una técnica denominada *on-*

*line* ya que a medida que los péptidos van eluyendo de la columna, van siendo fragmentados y analizados en la trampa. Los datos obtenidos se analizaron con el motor de búsqueda en bases de datos MASCOT con el fin de identificar el mayor número posible de proteínas presentes en la muestra.

Mediante este protocolo se obtuvo un listado de proteínas para cada una de las tres muestras analizadas (A, B y C).

Las listas iniciales de proteínas obtenidas mediante la búsqueda con MASCOT fueron depuradas a partir de los criterios establecidos en la *Sección 7.4.6.2. GeLC-MS* de Materiales y Métodos.

Como resultado de este estudio de proteómica se obtuvieron listas con un total de 17 (A), 16 (B) y 14 (C) proteínas como candidatas a estar en cada una de las muestras analizadas ([Tablas A, B y C](#)). En el caso de las muestras obtenidas mediante los protocolos B y C, también se presentan los péptidos que fueron analizados por MS/MS ([Tabla B \(II\)](#) y [Tabla C \(II\)](#)).

Una vez obtenidas las listas de proteínas, se realizó un análisis exhaustivo en base a conocimientos previos y a la naturaleza de la muestra.

Teniendo en cuenta que, como se mencionó anteriormente, las cLD poseen asociadas proteínas involucradas en procesos catabólicos, anabólicos y de movilización de lípidos, y que las nLD, al igual que las cLD, constituyen un dominio lipídico dinámico, que responde a estímulos externos (adición de AO), podríamos esperar que alguna de las proteínas asociadas a las nLD pertenezca al metabolismo lipídico.

Los datos de proteómica obtenidos a partir de la muestra en la que se analizaron las proteínas totales presentes en las nLD (protocolo B), mostraron la presencia de una sola proteína asociada al metabolismo lipídico ([Tabla B \(I\)](#) y [Tabla B \(II\)](#)), la Carboxilesterasa 1d (Ces1d). Así mismo, se identificaron histonas (H2A.Z y H3.3), ribonucleoproteínas (hnRNP A2/B1, K, M y H), factores de *splicing* (DX39B), *heat shock proteins* (Heat shock cognate 71 kDa protein), actina, y un marcador tumoral (LAS2, proteína asociada a la proliferación celular). Es interesante resaltar que la presencia de hnRNP y *heat shock proteins* confirmarían los datos preliminares en los que se encontraron estas proteínas a partir de una muestra

cruda de banda  $\alpha$  utilizando MALDI-TOF MS (Sección 5.2.3. *Identificación de proteínas por PMF MALDI-TOF MS*).

Cuando se eliminaron las proteínas unidas débilmente a las nLD a partir del tratamiento con NaCl, en el estudio de proteómica de las proteínas remanentes en las gotas lipídicas (protocolo C) se identificaron histonas (H2A.Z, H2B.1A, H3.3 y H4), ribonucleoproteínas (hnRNP A2/B1 y M) y marcadores tumorales (AKAP4 y SNED1) (Tabla C).

En cuanto a las proteínas analizadas en la muestra total de banda  $\alpha$  (protocolo A), se identificaron histonas (H2A.J, H2A.Y, H2B.1, H2B.1A y H3.3), ribonucleoproteínas (hnRNP A2/B1 y M), una proteína del metabolismo lipídico (ECHP, *peroxisomal bifunctional enzyme*, involucrada en la  $\beta$ -oxidación lipídica), una proteína del transporte nuclear (importina IMB1), factores de transcripción (MATR3 y EF1A1), y proteínas asociadas a la formación de puentes disulfuro (PDIA4) y modificaciones post-traduccionales: plegamiento de proteínas (GRP78) y glicosilación de proteínas (OGT1) (Tabla A).

Es interesante resaltar que en la muestra de proteínas de nLD que fueron tratadas con NaCl no se identificaron proteínas tales como las *heat shock proteins*, la actina y la proteína Ces1d, presentes en la muestra de proteínas totales de las nLD (sin tratar con NaCl) (Tabla B). Por lo tanto, podemos considerar que estas proteínas se encontrarían interaccionando con las nLD mediante uniones débiles y que fueron eliminadas mediante el tratamiento con NaCl utilizado en el protocolo C (Tabla C). Resulta singular que los dos marcadores tumorales identificados en la Tabla 3 están ausentes en la muestra de proteínas totales de las nLD, y, por lo tanto, podemos suponer que se encontraban enmascarados por la presencia de otras proteínas que fueron eliminadas en el tratamiento con NaCl.

Muchas de las proteínas identificadas en la muestra de banda  $\alpha$  (protocolo A, Tabla A) no se encontraron presentes en las muestras B y C (Tablas B y C), indicando que probablemente hayan sido eliminadas durante los protocolos de obtención de las proteínas de las nLD (protocolos B y C). Cabe destacar que la proteína ECHP que participa en la  $\beta$ -oxidación lipídica solo se encontró en la muestra A (Tabla A), y a la fecha, la  $\beta$ -oxidación lipídica no ha sido descrita en el núcleo celular. Existe la posibilidad de que ECHP presente en la banda  $\alpha$  (muestra A) no sea una proteína asociada a las nLD, ya que no fue identificada en las

muestras B y C (Tablas B y C). Para validar esta hipótesis restan realizar los correspondientes estudios de inmunofluorescencia.

Las histonas H2A y H2B identificadas en asociación con las nLD ya han sido descritas y ampliamente estudiadas en las cLD [129]. Si bien están ampliamente documentadas las funciones de las histonas en relación al ADN, resta validar la ubicación de las mismas en las nLD y determinar su función.

Del total de proteínas identificadas por el estudio de proteómica, consideramos que Ces1d, una proteína del metabolismo lipídico que se identificó en las proteínas totales de las nLD (protocolo B), sería candidata a ser la proteína marcadora de las gotas lipídicas nucleares. Si bien existe información sobre sus posibles funciones y su localización en el citoplasma, asociada al ER [130], [131], a las ILD [132], y a las cLD [133], [134], hasta el momento nunca había sido descrita en el núcleo celular.

La Carboxilesterasa 1d, pertenece a la familia de las carboxilesterasas, una clase de enzimas hidrolíticas cuya función está asociada al metabolismo lipídico [97] y a la detoxificación de drogas [97], [135]. Esta enzima posee actividad carboxilesterasa, etil-éster-ácido-graso sintasa [136], [137], esterol-esterasa [138], retinil-ester hidrolasa [139] y triacilglicerol-hidrolasa [140].

En base a estos resultados se decidió realizar una serie de ensayos de manera de validar la presencia de la misma en el núcleo y en las gotas lipídicas nucleares, mediante otras técnicas experimentales.

### **Conclusión (5.3.)**

En conclusión, se diseñó una importante herramienta metodológica que fue adecuada para abordar el estudio de proteómica de las nLD mediante la técnica de GeLC-MS. Es necesario que la muestra a analizar sea previamente concentrada en proteínas y que se eliminen los interferentes para el posterior análisis proteómico. Las nLD constituyen una muestra biológica compleja ya que poseen un bajo porcentaje de las proteínas celulares (0,0004%) y están constituidas por una alta proporción de moléculas hidrofóbicas (lípidos neutros).

Algunas de las proteínas identificadas en el subproteoma de las nLD ya habían sido descritas en asociación a las cLD, y otras fueron descritas por primera vez en el núcleo celular. Dentro de las proteínas descritas, algunas poseen funciones estructurales, enzimáticas, otras constituyen factores de transcripción y marcadores de cáncer.

Ninguna de las dos proteínas identificadas asociadas al metabolismo lipídico, Ces1d y ECHP, ni los procesos de lipólisis y de  $\beta$ -oxidación lipídica en los que participan, habían sido descritos hasta el momento en el núcleo celular. Pero teniendo en cuenta que, solo Ces1d fue encontrada en la muestra purificada de nLD (protocolo B), elegimos a la Carboxilesterasa 1d como posible proteína marcadora de las nLD.

**Tabla A.** Identificación de proteínas presentes en la Banda  $\alpha$ .

Acceso	Proteína	Score	N° Péptidos
H2B1_RAT	Histone H2B type 1 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	404.7	11
H33_RAT	Histone H33 OS=Rattus norvegicus GN=H3f3b PE=1 SV=2	333.7	10
HNRPM_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnrm PE=1 SV=4	321.5	11
H2B1A_RAT	Histone H2B type 1-A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ba PE=1 SV=2	315.5	8
IMB1_RAT	Importin subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Kpnb1 PE=1 SV=1	161.0	3
H2AJ_RAT	Histone H2AJ OS=Rattus norvegicus GN=H2afj PE=2 SV=1	142.3	4
ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=1	142.2	4
MATR3_RAT	Matrin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Matr3 PE=1 SV=2	134.1	3
ECHP_RAT	Peroxisomal bifunctional enzyme OS=Rattus norvegicus GN=Ehhadh PE=1 SV=2	115.0	3
H2AY_RAT	Core histone macro-H2A1 OS=Rattus norvegicus GN=H2afy PE=1 SV=4	91.5	2
EF1A1_RAT	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Rattus norvegicus GN=Esf1a1 PE=1 SV=1	72.6	1
GRP78_RAT	78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa5 PE=1 SV=1	68.1	1
K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1	45.0	1
K2C4_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Rattus norvegicus GN=Krt4 PE=3 SV=1	41.4	1
OGT1_RAT	UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa	40.1	1
PDIA4_RAT	Protein disulfide-isomerase A4 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia4 PE=1 SV=2	38.3	1
K1C19_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Rattus norvegicus GN=Krt19 PE=1 SV=2	37.9	1

Acceso: código de acceso de la proteína en la base de datos de UniProt. N° Péptidos: números de péptidos identificados para cada proteína.

**Tabla B (I).** Identificación de proteínas totales de nLD.

Acceso	Proteína	Score	N° Péptidos
HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=1 SV=1	257.2	7
K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1	238.3	5
K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1	220.4	4
K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1	187.5	4
ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=1	154.1	4
K2C1B_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Rattus norvegicus GN=Krt77 PE=3 SV=1	127.7	2
K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus GN=Krt6a PE=1 SV=1	122.8	3
HNRPK_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpk PE=1 SV=1	87.1	2
H33_RAT	Histone H3.3 OS=Rattus norvegicus GN=H3f3b PE=1 SV=2	82.8	3
CES1D_RAT	Carboxylesterase 1D OS=Rattus norvegicus GN=Ces1d PE=1 SV=2	67.5	2
HNRPM_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpm PE=1 SV=4	62.0	2
H2AZ_RAT	Histone H2A.Z OS=Rattus norvegicus GN=H2afz PE=1 SV=2	61.6	1
ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	61.3	1
HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnp1 PE=1 SV=2	56.1	2
LAS2_RAT	Lung adenoma susceptibility protein 2 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Las2 PE=2 SV=1	42.9	1
DX39B_RAT	Spliceosome RNA helicase Ddx39b OS=Rattus norvegicus GN=Ddx39b PE=1 SV=3	36.2	1

Acceso: código de acceso de la proteína en la base de datos de UniProt. N° Péptidos: números de péptidos identificados para cada proteína.

**Tabla B (II).** Péptidos de fragmentación de proteínas de nLD.

Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
R.DYQALLGAK.L	327.096	977.5182	64.60	15.6		451 - 459	K2C1B_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Rattus norvegicus GN=Krt77 PE=3 SV=1
R.ILLQSK.N	351.286	700.4483	33.10	16.4		47 - 52	HNRPK_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpk PE=1 SV=1
K.DIQLAR.R	358.267	714.4024	34.70	18.2		124 - 129	H33_RAT	Histone H3.3 OS=Rattus norvegicus GN=H3f3b PE=1 SV=2
R.YVEVFK.S	392.758	783.4167	40.60	20.6		82 - 87	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnp1 PE=1 SV=2
K.VQVEYKGETK.S	394.260	1179.6136	29.50	24.3		103 - 112	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=1 SV=1
R.LAADDFR.L	404.269	806.3923	37.70	51.4		228 - 234	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
R.LAADDFR.L	404.269	806.3923	37.70	51.4		175 - 181	K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1
K.STELLIR.K	416.304	830.4862	39.80	46.5		58 - 64	H33_RAT	Histone H3.3 OS=Rattus norvegicus GN=H3f3b PE=1 SV=2
K.IELLILK.A	421.305	840.5684	35.90	42.9		197 - 203	LAS2_RAT	Lung adenoma susceptibility protein 2 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Las2 PE=2 SV=1
R.GTLDPVEK.A	429.751	857.4494	33.00	27.2		312 - 319	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=1 SV=1



Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
K.LDLLGNPK.E	435.298	868.5018	44.00	21.5		305 - 312	CES1D_RAT	Carboxylesterase 1D OS=Rattus norvegicus GN=Ces1d PE=1 SV=2
K.NKYEDEINKR.T	436.941	1307.6470	29.50	35.4		255 - 264	K2C1B_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Rattus norvegicus GN=Krt77 PE=3 SV=1
K.SLVNLGGGR.S	437.282	871.4876	39.80	15.2		69 - 77	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1
K.DLAGSIIGK.G	437.286	872.4967	45.10	34.1		397 - 405	HNRPK_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpk PE=1 SV=1
R.SGRGGNFGFGDSR.G	438.593	1312.5909	37.00	28.1		201 - 213	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=1
R.MGANSLER.M	439.294	876.4124	31.40	45.8		531 - 538	HNRPM_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpm PE=1 SV=4
R.TAAENEFVTLKK.D	450.976	1349.7191	38.20	26.2		250 - 261	K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus GN=Krt6a PE=1 SV=1
R.DVQEIFR.M	453.836	905.4607	45.40	36.2		210 - 216	DX39B_RAT	Spliceosome RNA helicase Ddx39b OS=Rattus norvegicus GN=Ddx39b PE=1 SV=3
R.SRNTDEMVELR.I	455.824	1364.6354	31.70	36.6	Oxid.: 7	36 - 46	HNRPK_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpk PE=1 SV=1
R.TNAENEFVTIKK.D	465.303	1392.7249	38.80	48.0		277 - 288	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1

Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
K.VCNPIITK.L	472.785	943.5161	36.20	24.4	Carb.: 2	602 - 609	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=1 SV=1
R.AGLQFPVGR.I	472.825	943.5240	44.80	61.6		24 - 32	H2AZ_RAT	Histone H2A.Z OS=Rattus norvegicus GN=H2afz PE=1 SV=2
K.AGFAGDDAPR.A	488.801	975.4410	32.90	61.3		19 - 28	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1
K.YENEVALR.Q	497.302	992.4927	36.30	38.7		237 - 244	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
R.GGNFGFGDSR.G	507.248	1012.4363	40.50	44.5		204 - 213	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnnpa2b1 PE=1 SV=1
K.TPEEILAEK.S	515.321	1028.5390	40.20	46.0		330 - 338	CES1D_RAT	Carboxylesterase 1D OS=Rattus norvegicus GN=Ces1d PE=1 SV=2
R.VLDELTAR.T	515.383	1028.5866	46.90	56.1		204 - 212	K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1
R.YRPGTVALR.E	516.907	1031.5876	32.80	18.0		42 - 50	H33_RAT	Histone H3.3 OS=Rattus norvegicus GN=H3f3b PE=1 SV=2
K.VTMQNLNDR.L	545.832	1089.5237	33.50	53.0		96 - 104	K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1
K.VTMQNLNDR.L	545.832	1089.5237	33.50	53.0		147 - 155	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.VTMQNLNDR.L	553.825	1105.5186	24.90	27.0	Oxid.: 3	96 - 104	K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1

Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
K.VTMQNLNDR.L	553.825	1105.5186	24.90	27.0	Oxid.: 3	147 - 155	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.AQYEEIAKR.S	554.324	1106.5720	33.00	62.8		328 - 336	K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus GN=Krt6a PE=1 SV=1
K.DAEAWFNEK.S	555.331	1108.4825	46.00	50.7		334 - 342	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.ALSRQEMQEVQSSR.S	555.614	1663.7948	29.80	39.8	Oxid.: 7	187 - 200	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=1
R.INEILSNALK.R	557.877	1113.6394	47.50	16.1		332 - 341	HNRPM_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnmp PE=1 SV=4
K.HTGPNSPDTANDGFVR.L	562.639	1683.7601	35.10	35.5		99 - 114	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnph1 PE=1 SV=2
K.STAGDTHLGGEDFDNR.M	564.966	1690.7183	36.80	42.6		221 - 236	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=1 SV=1
R.DYQELMNTK.L	571.788	1140.5121	42.20	26.0		463 - 471	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1
R.LENEIQTYR.S	583.369	1164.5775	36.40	17.5		441 - 449	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.YEELQITAGR.H	590.335	1178.5932	41.00	33.8		349 - 358	K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus GN=Krt6a PE=1 SV=1
K.DAGTIAGLNVLR.I	600.389	1198.6670	51.30	37.7		160 - 171	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus

Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
K.VEIIANDQGNR.T	614.873	1227.6208	35.20	33.7		26 - 36	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=1 SV=1
R.TNAENEFVTIK.K	633.371	1264.6299	42.20	54.5		277 - 287	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1
R.GGGGNFGPGGSNFR.G	689.360	1376.6222	40.30	41.7		214 - 228	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=1
R.FLEQQNQVLQTK.W	738.433	1474.7780	39.80	76.7		199 - 210	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1
R.FLEQQNQVLQTK.W	738.433	1474.7780	39.80	76.7		187 - 198	K2C1B_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Rattus norvegicus GN=Krt77 PE=3 SV=1
K.NQVAMNPTNTVFDK.R	833.395	1664.7828	41.60	67.2	Oxid.: 5	57 - 71	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=1 SV=1

*Secuencia*: secuencia aminoacídica del péptido teórico (de la base de datos) asignado. Los puntos corresponden a los sitios de corte de la enzima tripsina en la cadena aminoacídica. *m/z meas.*: valor del producto entre la masa y la carga del péptido parental. *Mr calc.*: masa relativa calculada del péptido parental sin carga. *Rt [min]*: tiempo de retención. *Modif.*: modificaciones por carbamilometilación de la cisteína (carb.) u oxidación de la metionina (oxid.). *Rango*: posición del péptido en la secuencia aminoacídica de la proteína a la que pertenece. *Acceso*: código de acceso de la proteína en la base de datos de UniProt.

**Tabla C (I).** Identificación de proteínas de nLD tratadas con NaCl.

Acceso	Proteína	Score	Nº Péptidos
K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1	636.3	12
K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1	330.6	6
K22E_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Rattus norvegicus GN=Krt2 PE=3 SV=1	306.8	5
K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1	255.9	5
K2C5_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Rattus norvegicus GN=Krt5 PE=1 SV=1	221.2	5
K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus GN=Krt6a PE=1 SV=1	195.1	4
ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnnpa2b1 PE=1 SV=1	161.0	5
K2C8_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Rattus norvegicus GN=Krt8 PE=1 SV=3	127.8	3
H4_RAT	Histone H4 OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h4b PE=1 SV=2	78.2	2
H2B1A_RAT	Histone H2B type 1-A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ba PE=1 SV=2	77.3	3
AKAP4_RAT	A-kinase anchor protein 4 OS=Rattus norvegicus GN=Akap4 PE=1 SV=1	62.3	2
H2AZ_RAT	Histone H2A.Z OS=Rattus norvegicus GN=H2afz PE=1 SV=2	47.6	1
H33_RAT	Histone H3.3 OS=Rattus norvegicus GN=H3f3b PE=1 SV=2	40.7	1
SNED1_RAT	Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sned1 PE=2 SV=2	39.4	1

**Acceso:** código de acceso de la proteína en la base de datos de UniProt. **Nº**

**Péptidos:** números de péptidos identificados para cada proteína.

**Tabla C (II).** Péptidos de fragmentación de proteínas de nLD tratadas con NaCl.

Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
K.IKEWYEK.H	332.5790	994.5124	36.50	22.2		177 - 183	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.AGTHDPKCK.N	338.9160	1012.4760	23.90	24.0	Carb.: 8	451 - 459	AKAP4_RAT	A-kinase anchor protein 4 OS=Rattus norvegicus GN=Akap4 PE=1 SV=1
R.LAADDRLK.Y	350.2290	1047.5713	42.50	30.7		228 - 236	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
R.LAADDRLK.Y	350.2290	1047.5713	42.50	30.7		175 - 183	K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1
R.IAGEASR.L	352.1750	702.3661	84.40	19.1		75 - 81	H2B1A_RAT	Histone H2B type 1-A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ba PE=1 SV=2
K.FASFIDKVR.F	361.5810	1081.5920	44.00	41.5		163 - 171	K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus GN=Krt6a PE=1 SV=1
K.FASFIDKVR.F	361.5810	1081.5920	44.00	41.5		190 - 198	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1
K.FASFIDKVR.F	361.5810	1081.5920	44.00	41.5		175 - 183	K2C5_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Rattus norvegicus GN=Krt5 PE=1 SV=1
K.FASFIDKVR.F	361.5810	1081.5920	44.00	41.5		102 - 110	K2C8_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Rattus norvegicus GN=Krt8 PE=1 SV=3
R.SSHQLR.A	364.2570	726.3773	27.30	39.4		963 - 968	SNED1_RAT	Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sned1 PE=2 SV=2

Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
K.KYEDEINKR.T	398.9330	1193.6041	27.40	73.7		286 - 294	K22E_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Rattus norvegicus GN=Krt2 PE=3 SV=1
R.LRSEIDNVKK.Q	401.3060	1200.6826	28.10	27.0		392 - 401	K2C5_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Rattus norvegicus GN=Krt5 PE=1 SV=1
R.LAADDFR.L	404.2840	806.3923	39.60	50.4		175 - 181	K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1
R.LAADDFR.L	404.2840	806.3923	39.60	50.4		228 - 234	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
R.LASYLDK.V	405.2760	808.4331	35.80	38.1		105 - 111	K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1
R.EIQTAVR.L	408.8290	815.4501	30.10	22.5		95 - 101	H2B1A_RAT	Histone H2B type 1-A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ba PE=1 SV=2
K.STELLIR.K	416.3100	830.4862	41.90	40.7		58 - 64	H33_RAT	Histone H3.3 OS=Rattus norvegicus GN=H3f3b PE=1 SV=2
K.NKYEDEINKR.T	436.9310	1307.6470	31.30	49.6		177 - 186	K2C8_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Rattus norvegicus GN=Krt8 PE=1 SV=3
K.NKYEDEINKR.T	436.9310	1307.6470	31.30	49.6		252 - 261	K2C5_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Rattus norvegicus GN=Krt5 PE=1 SV=1
K.SLVNLGGGR.S	437.3080	871.4876	40.70	17.6		69 - 77	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1
R.SGRGGNFGFGDSR.G	438.9400	1312.5909	36.70	20.9		201 - 213	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=1

Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
R.DNIQGITKPAIR.R	442.6550	1324.7463	38.90	49.5		25 - 36	H4_RAT	Histone H4 OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h4b PE=1 SV=2
R.TAAENEFVTLKK.D	450.9300	1349.7191	39.50	25.4		250 - 261	K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus GN=Krt6a PE=1 SV=1
R.QSVEADINGLRR.V	453.2860	1356.7110	42.10	43.0		245 - 256	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.AEMKGKDK.G	461.8230	921.4590	38.00	38.3	Oxid.: 3	470 - 477	AKAP4_RAT	A-kinase anchor protein 4 OS=Rattus norvegicus GN=Akap4 PE=1 SV=1
R.GFSSGSAAVVSOGSRR.S	470.9650	1409.7011	32.90	26.5		23 - 37	K22E_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Rattus norvegicus GN=Krt2 PE=3 SV=1
R.AGLQFPVGR.I	472.8150	943.5240	46.80	47.6		24 - 32	H2AZ_RAT	Histone H2A.Z OS=Rattus norvegicus GN=H2afz PE=1 SV=2
R.TTAENEFVMLKK.D	476.2900	1425.7174	40.10	23.5	Oxid.: 9	262 - 273	K2C5_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Rattus norvegicus GN=Krt5 PE=1 SV=1
R.LLLPGELAK.H	477.3710	952.5957	49.50	35.7		102 - 110	H2B1A_RAT	Histone H2B type 1-A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ba PE=1 SV=2
R.DYSKYYK.T	483.7660	965.4494	34.40	25.1		194 - 200	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.YENEVALR.Q	497.3320	992.4927	35.80	63.2		237 - 244	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.LLEGEECR.L	503.3050	1004.4597	31.90	62.6	Carb.: 7	469 - 476	K2C5_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Rattus norvegicus GN=Krt5 PE=1 SV=1
K.LLEGEECR.M	503.3050	1004.4597	31.90	62.6	Carb.: 7	503 - 510	K22E_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Rattus



Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
R.GGNFGFGDSR.G	507.1900	1012.4363	40.30	53.0		204 - 213	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=1
K.VDPEIQNVK.S	521.3500	1040.5502	34.80	46.6		186 - 194	K22E_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Rattus norvegicus GN=Krt2 PE=3 SV=1
R.LASYLDKVR.A	532.8500	1063.6026	38.80	69.3		105 - 113	K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1
K.VTMQNLNDR.L	545.8050	1089.5237	35.00	67.4		147 - 155	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.VTMQNLNDR.L	545.8050	1089.5237	35.00	67.4		96 - 104	K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1
R.AQYEEIANR.S	547.3150	1092.5200	34.20	36.6		265 - 273	K2C8_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Rattus norvegicus GN=Krt8 PE=1 SV=3
K.VTMQNLNDR.L	553.7710	1105.5186	26.80	74.8	Oxid.: 3	96 - 104	K1C15_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Rattus norvegicus GN=Krt15 PE=1 SV=1
K.VTMQNLNDR.L	553.7710	1105.5186	26.80	74.8	Oxid.: 3	147 - 155	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.AQYEEIAKR.S	554.2870	1106.5720	34.90	67.5		328 - 336	K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus GN=Krt6a PE=1 SV=1
K.DAEAWFNEK.S	555.3060	1108.4825	47.90	52.5		334 - 342	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.ALSRQEMQEVQSSR.S	555.6600	1663.7948	29.50	25.9	Oxid.: 7	187 - 200	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=1

Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
R.LENEIQTYR.S	583.3700	1164.5775	37.40	57.7		441 - 449	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
K.YEELQITAGR.H	590.3660	1178.5932	42.00	60.6		349 - 358	K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus GN=Krt6a PE=1 SV=1
R.ISGLIYEETR.G	590.8480	1179.6136	45.20	28.7		47 - 56	H4_RAT	Histone H4 OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h4b PE=1 SV=2
R.QEMQEVQSSR.S	611.3130	1220.5455	28.20	43.8		191 - 200	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=1
R.LKYENEVALR.Q	617.8890	1233.6717	38.50	50.3		235 - 244	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
R.QSSVSFRSGGSR.S	627.8400	1253.6113	35.10	17.0		4 - 15	K2C5_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Rattus norvegicus GN=Krt5 PE=1 SV=1
R.GFSSGSVVSGGSR.R	627.8500	1253.6000	35.50	97.4		23 - 36	K22E_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Rattus norvegicus GN=Krt2 PE=3 SV=1
R.TNAENEFVTIK.K	633.3780	1264.6299	43.20	71.5		277 - 287	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1
R.GGGGNFGPGGSNFR.G	689.2870	1376.6222	40.00	17.4		214 - 228	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=1
K.QSLEASLAETEGR.Y	695.9450	1389.6736	44.20	99.0		386 - 398	K1C10_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
R.TNAENEFVTIKK.D	697.3890	1392.7249	38.50	54.8		277 - 288	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1

Secuencia	m/z meas.	Mr calc.	Rt [min]	Score	Modif.	Rango	Acceso	Proteína
R.FLEQQNQVLQTK.W	738.4270	1474.7780	41.80	70.5		199 - 210	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1

*Secuencia*: secuencia aminoacídica del péptido teórico (de la base de datos) asignado. Los puntos corresponden a los sitios de corte de la enzima tripsina en la cadena aminoacídica. *m/z meas.*: valor del producto entre la masa y la carga del péptido parental. *Mr calc.*: masa relativa calculada del péptido parental sin carga. *Rt [min]*: tiempo de retención. *Modif.*: modificaciones por carbamilometilación de la cisteína (carb.) u oxidación de la metionina (oxid.). *Rango*: posición del péptido en la secuencia aminoacídica de la proteína a la que pertenece. *Acceso*: código de acceso de la proteína en la base de datos de UniProt.

## 5.4. CARBOXILESTERASA EN EL NÚCLEO CELULAR

### 5.4.1. Topología celular de la carboxilesterasa

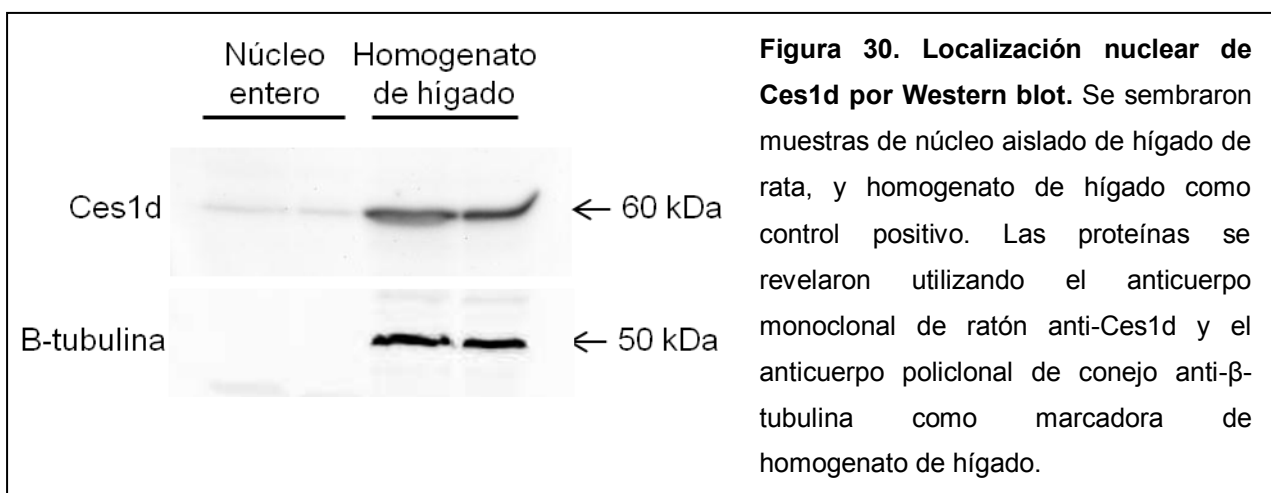
Habiendo identificado por análisis de proteómica a la enzima Ces1d en las nLD aisladas de hígado de rata, el siguiente objetivo fue validar la presencia de la carboxilesterasa en el núcleo y, en particular, asociada a las nLD, teniendo en cuenta que al momento no había sido identificada en el núcleo celular. Con este fin se evaluó la siguiente hipótesis:

*La carboxilesterasa 1d es una proteína marcadora de las nLD*

#### 5.4.1.1. Validación de la localización nuclear de la carboxilesterasa

Con el fin de validar la presencia de la carboxilesterasa en el núcleo celular, se realizó un ensayo de Western blot en una muestra de núcleo aislado de hígado de rata, utilizando homogenato de hígado como control.

Como se observa en la [Figura 30](#), los resultados del Western blot revelaron la presencia de la proteína Ces1d tanto en núcleo aislado, como también en homogenato celular, validando de esta manera los resultados de proteómica. Se utilizó como proteína marcadora de homogenato celular a la  $\beta$ -tubulina, que es una proteína del citoesqueleto presente en el citosol que no se encuentra en el núcleo.



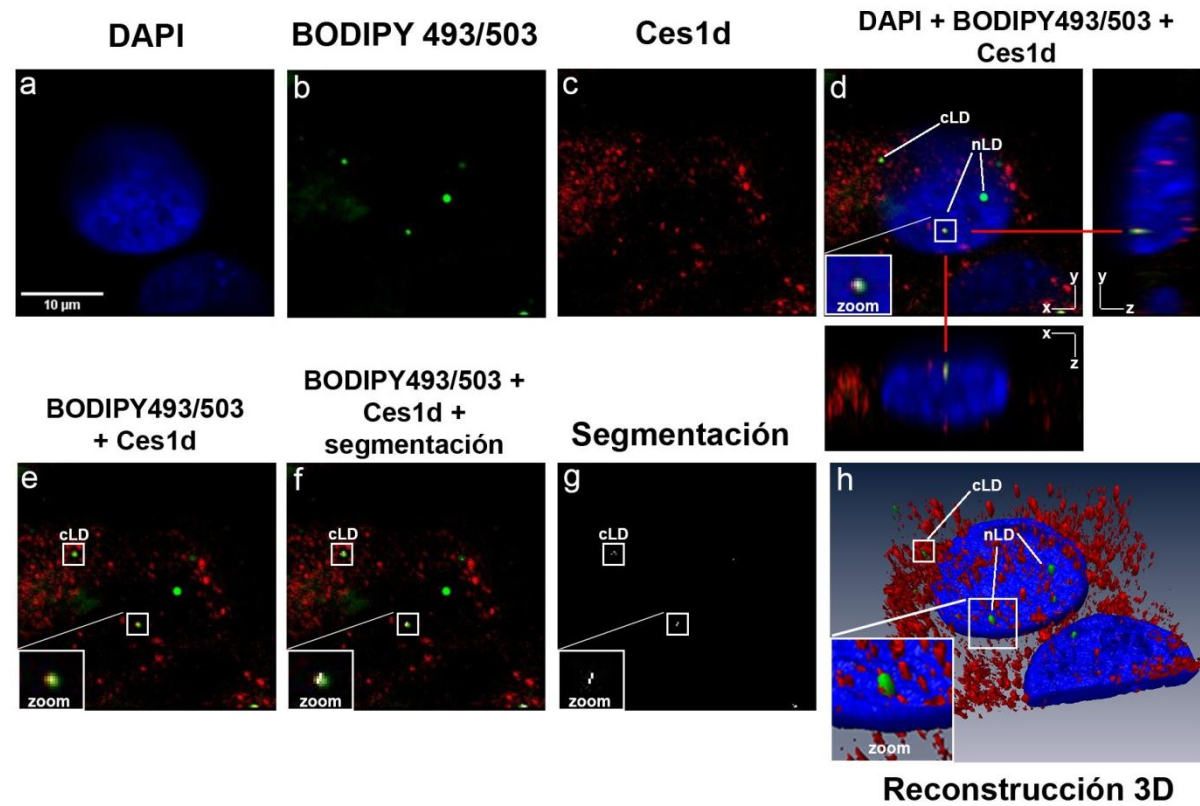
En el control positivo de homogenato de hígado se observó una banda inmunoreactiva de la carboxilesterasa mucho más intensa que la correspondiente a la muestra de núcleo celular. Teniendo en cuenta que la carboxilesterasa fue identificada en las nLD, y que las proteínas totales de las gotas lipídicas nucleares corresponden al 0,0004% de las proteínas celulares, era de esperar que la banda inmunoreactiva de la muestra de núcleo fuera más tenue que la de homogenato celular.

#### 5.4.1.2. Validación de la localización de la carboxilesterasa en las nLD

Habiendo confirmado la presencia de la carboxilesterasa en el núcleo celular, el siguiente objetivo fue determinar si dentro del núcleo la misma se localiza en las nLD.

Teniendo en cuenta que la carboxilesterasa ya ha sido identificada en el ER y en las cLD, decimos utilizar como modelo experimental un cultivo celular para los estudios de inmunofluorescencia por microscopía confocal, y así la localización citosólica de la proteína constituya un control positivo para los ensayos nucleares.

En la [Figura 31](#) podemos observar en azul el núcleo celular (tinción con DAPI) ([Figura 31a](#)), en verde las gotas lipídicas (tinción con BODIPY 493/503) ([Figura 31b](#)), y en rojo la carboxilesterasa (marcación con anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ces1d) ([Figura 31c](#)). Mediante la superposición de las imágenes del seccionamiento óptico se reconstruyó la imagen proyectada en los planos xz e yz ([Figura 31d](#)). Tanto en las vistas ortogonales ([Figura 31d](#)) como en la reconstrucción tridimensional generada ([Figura 31h](#)) es posible observar que en células HepG2 en condiciones estándar de cultivo, la carboxilesterasa se encuentra ampliamente distribuida no solo en el citosol (control positivo), sino también dentro del núcleo celular. En la imagen de superposición ([Figura 31e – merge](#)) se detecta la presencia de puntos de colocalización en amarillo, lo que indica que la proteína dentro del núcleo interactúa con las nLD, si bien parte de la misma se encuentra dispersa en la matriz nuclear. Esta colocalización puede observarse con mayor facilidad en la imagen de *segmentación*, donde sólo se observan las zonas de colocalización en blanco ([Figura 31g](#)).



**Figura 31. Localización de la carboxilesterasa en las nLD.** Análisis por inmunofluorescencia de células HepG2 cultivadas en condiciones control. En rojo se observa la fluorescencia debida a la carboxilesterasa, en azul, DAPI y en verde, BODIPY 493/503. En el recuadro se marca la presencia de cLD, y de nLD (zoom).

En el citosol, confirmando datos bibliográficos, pudo observarse que la carboxilesterasa se encuentra ampliamente distribuida (posible localización en el ER) (Figura 31h) y colocaliza con las cLD (Figura 31g - *segmentación*).

Una forma de obtener un valor numérico de la colocalización es a través del coeficiente de correlación de Pearson (PCC), que permite cuantificar la colocalización mediante la expresión numérica de píxeles que co-ocurren (presencia de dos fluoróforos en píxeles individuales) como una fracción del número total [141]. El mismo se expresa en valores que van de -1,0 a 1,0, representando ausencia de colocalización (-1) y perfecta colocalización (1). Valores cercanos a 0,5 indican existencia de baja colocalización, mientras que valores de 0,8 a 1 indican alta colocalización.

El PCC se define como la suma del producto de las dos intensidades (verde y rojo) en píxeles homólogos, dividido el valor correspondiente al producto máximo observado (perfecta colocalización).

El método funciona ya que el numerador se maximiza cuando las intensidades relativas de los dos fluoróforos coincide: alta con alta y baja con baja, mientras que la combinación de alta con baja reduce la suma de sus productos. El denominador actúa limitando el rango del coeficiente de -1,0 a 1,0.

$$r = \frac{\sum (R_i - R_{av}) \cdot (G_i - G_{av})}{\sqrt{\sum (R_i - R_{av})^2 \cdot \sum (G_i - G_{av})^2}}$$

Donde  $R_i$  es la intensidad del primer fluoróforo (verde) en píxeles individuales y  $R_{av}$  la media aritmética, mientras que  $G_i$  y  $G_{av}$  son las intensidades correspondientes al segundo fluoróforo (rojo) en los mismos píxeles.

La correlación de Pearson considera la fluorescencia en forma total, por lo tanto, si existe una señal de fluorescencia con mayor intensidad con respecto a la otra, los valores de colocalización son menospreciados. Surgen entonces los coeficientes  $M_1$  y  $M_2$  de Mander ("*M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> coefficients*") que, de manera individual para cada fluoróforo, registran la fracción de la fluorescencia total que co-ocurre.

$$M_1 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum R_i} \quad M_2 = \frac{\sum G_{i,coloc}}{\sum G_i}$$

Donde,  $R_{i,coloc}$  es la intensidad del fluoróforo verde en píxeles donde el fluoróforo rojo está presente; y  $G_{i,coloc}$  es la intensidad del fluoróforo rojo en píxeles donde el fluoróforo verde está presente.

Los coeficientes  $M_1$  y  $M_2$  se expresan en valores dentro del rango 0 a 1. Valores de  $M_1$  y  $M_2$  menores a 0,5 indican ausencia de colocalización, en tanto que valores de 0,5 a 1 indican que existe colocalización.

En las células HepG2 en condiciones estándar de cultivo ([Figura 31](#)), la correlación de Pearson es de 0,5-0,6 lo que indica que si bien es baja, existe colocalización entre las gotas lipídicas y la carboxilesterasa.

Cuando calculamos los coeficientes  $M_1$  (para las gotas lipídicas, verde) y  $M_2$  (para la carboxilesterasa, rojo) obtuvimos valores de  $M_1$  de 0,7-0,8, y valores de  $M_2$  de 0,5-0,6 lo que indica que solo el 50-60% de las intensidades de píxeles de la proteína carboxilesterasa colocaliza con las gotas lipídicas. Este bajo valor de colocalización de la enzima con las LD (cLD+nLD) se debe a la señal roja distribuida en el citosol y en la matriz nuclear que no está asociada a las LD.

#### **Conclusión (5.4.1.)**

Hemos demostrado por primera vez la localización de la carboxilesterasa en condiciones fisiológicas dentro del núcleo celular, distribuida en la matriz nuclear y asociada a las nLD.

Así mismo hemos determinado la topología celular de la enzima, y en condiciones fisiológicas, la carboxilesterasa se localiza mayoritariamente en el citosol, y en menor proporción en el núcleo celular. Por su parte, dentro del citosol colocaliza con las cLD en baja proporción, ya que además se encuentra dispersa, colocalizando posiblemente con el ER y/o con otras estructuras celulares.

No podemos validar la hipótesis de trabajo, dado que la carboxilesterasa en condiciones fisiológicas no solo se encuentra asociada a las nLD, sino también distribuida en la matriz nuclear, y por lo tanto no sería una proteína exclusiva de las gotas lipídicas nucleares.



### 5.4.2. Rol de la carboxilesterasa de las nLD en el metabolismo lipídico nuclear y celular

Hemos demostrado que las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico, cuya morfología y génesis está modulada por el AO, que determina un fenotipo anabólico, caracterizado por un aumento en el número, tamaño y contenido respecto del control, no solo de las nLD, sino también de las cLD. Cuando se elimina el AO del medio de cultivo se genera un fenotipo catabólico que restablece los parámetros de la condición control (*Sección 4.4. Efecto del Ácido Oleico y TriacsinC en parámetros morfológicos de LD en hepatocitos de rata y células HepG2*).

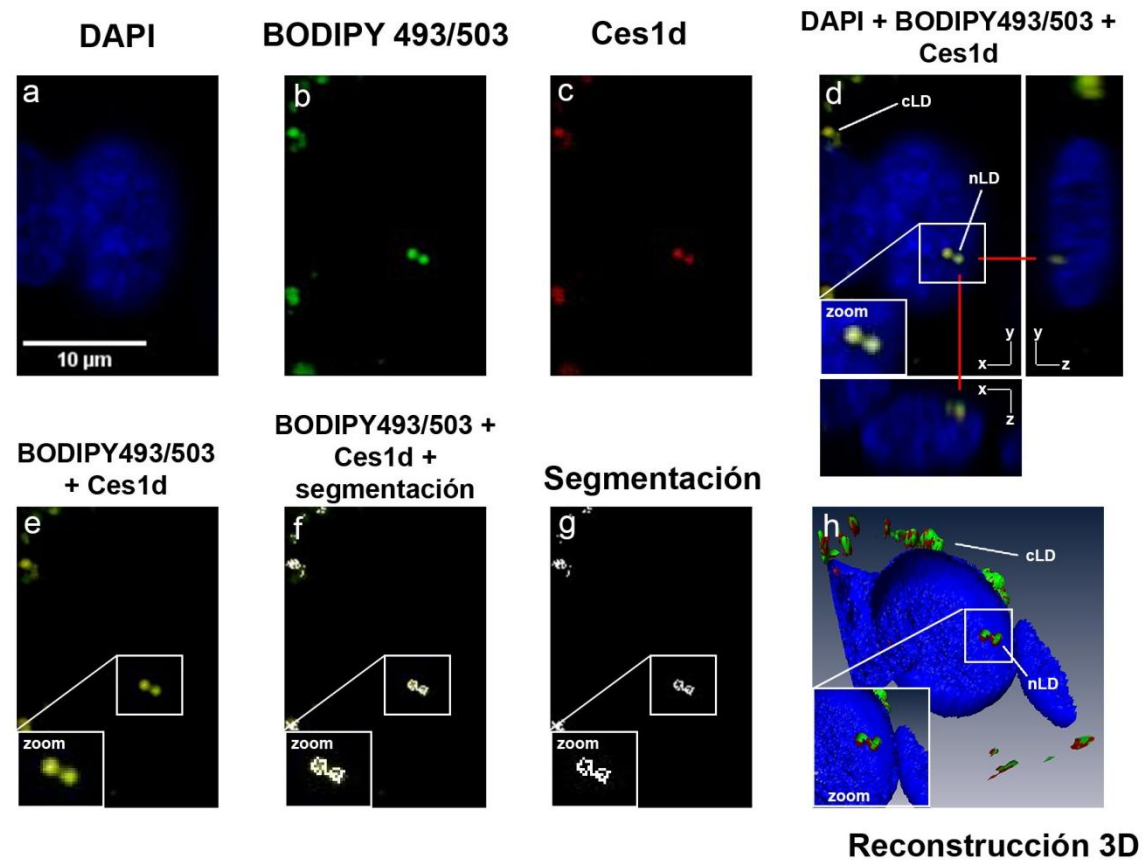
Habiendo validado la presencia de la carboxilesterasa en las nLD, el siguiente objetivo fue determinar si la misma está involucrada en el metabolismo lipídico celular en respuesta al tratamiento con AO como estímulo externo. Con este fin, se evaluó la siguiente hipótesis:

*La carboxilesterasa trasloca a las nLD en respuesta al AO, como está descrito que ocurre en las cLD de las células espumosas [142]*

#### 5.4.2.1. Efecto del AO en la carboxilesterasa de las nLD en células HepG2

Con este fin, se incubaron células HepG2 por 24 h con AO 400  $\mu$ M (*Sección 4.4.1. Efecto del Ácido Oleico*), y se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal.

Como se observa en la [Figura 32](#), el AO determina un cambio dramático en la distribución celular de la proteína carboxilesterasa, ya que se localiza casi exclusivamente en las nLD y cLD ([Figura 32c y Figura 32h](#)) y prácticamente no se observa proteína dispersa en la matriz nuclear ni en el citosol, como sí sucede en la condición control. La superposición de imágenes ([Figura 32e y Figura 32f](#)) revela una total colocalización de las nLD y cLD con la enzima, lo cual queda corroborado en la imagen de *segmentación* ([Figura 32g](#)). Las vistas ortogonales ([Figura 32d](#)) y la reconstrucción tridimensional ([Figura 32h](#)) confirman la presencia de las nLD y de la carboxilesterasa en el interior del núcleo celular.



**Figura 32. Efecto del AO en la localización de la carboxilesterasa.** Análisis por inmunofluorescencia de células HepG2 tratadas por 24 h con AO 400 μM. En rojo se observa la fluorescencia debida a la carboxilesterasa, en azul DAPI y en verde BODIPY 493/503. En el recuadro se marca la presencia de nLD (zoom).

La colocalización se cuantificó mediante el coeficiente de Pearson, y se obtuvieron valores entre 0,9 y 1, lo que indica una casi total colocalización entre la carboxilesterasa y las LD (nLD y cLD). Cuando se evaluaron los coeficientes  $M_1$  (verde) y  $M_2$  (rojo) de Mander, se obtuvieron valores de  $M_1$  cercanos a 1, indicando que la casi totalidad de las intensidades de píxeles verde se encuentran colocalizando con el fluoróforo rojo, por su parte, para el coeficiente  $M_2$  los valores también fueron cercanos a 1, es decir que casi el 100% de las intensidades de píxeles del fluoróforo rojo se encuentran donde el fluoróforo verde está presente. Por lo tanto, por efecto del AO, la casi totalidad de la carboxilesterasa (rojo) se encuentra en las nLD y cLD, y no dispersa en el núcleo y en el citosol, respectivamente, como sucede en la condición control.

Por lo tanto, podemos afirmar que el AO determina una translocación de la proteína dispersa en la matriz nuclear y en el citosol a las nLD y cLD.

El AO determinó un aumento en la síntesis de LN (TAG, C y EC) y PL, que a su vez produjo un aumento en el número y tamaño de las nLD y cLD. Es interesante resaltar, que al mismo tiempo que aumenta el contenido de lípidos neutros en las LD, la carboxilesterasa transloca a la superficie de las mismas, probablemente para restablecer el fenotipo inicial al hidrolizar tanto TAG como CE, los LN mayoritarios del core hidrofóbico de ambas LD.

#### 5.4.2.2. Carboxilesterasa de nLD en células HepG2 post tratamiento con AO

Células HepG2 tratadas por 24 h con AO 400  $\mu$ M se incubaron post tratamiento con medio fresco en ausencia de AO, por 48 ó 72 h (*Sección 4.4.2. El efecto del AO es reversible*). Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia por microscopía confocal.

Como se observa en las Figuras 33 y 34, tanto a las 48 h como a las 72 h post tratamiento con AO (-AO(48) y -AO(72)) la proteína carboxilesterasa colocaliza con las nLD y cLD, y no se presenta dispersa en el núcleo ni en el citosol, como se observa en la condición control.

Tanto las Figuras 33d y 34h como las Figuras 33d y 34h confirman la localización de la proteína en el interior del núcleo celular. Mediante las figuras de

superposición (Figura 33e y Figura 34e) y de *segmentación* (Figura 33g y Figura 34g) se observa que al igual que en AO400 la carboxilesterasa colocaliza casi totalmente con las nLD y cLD.

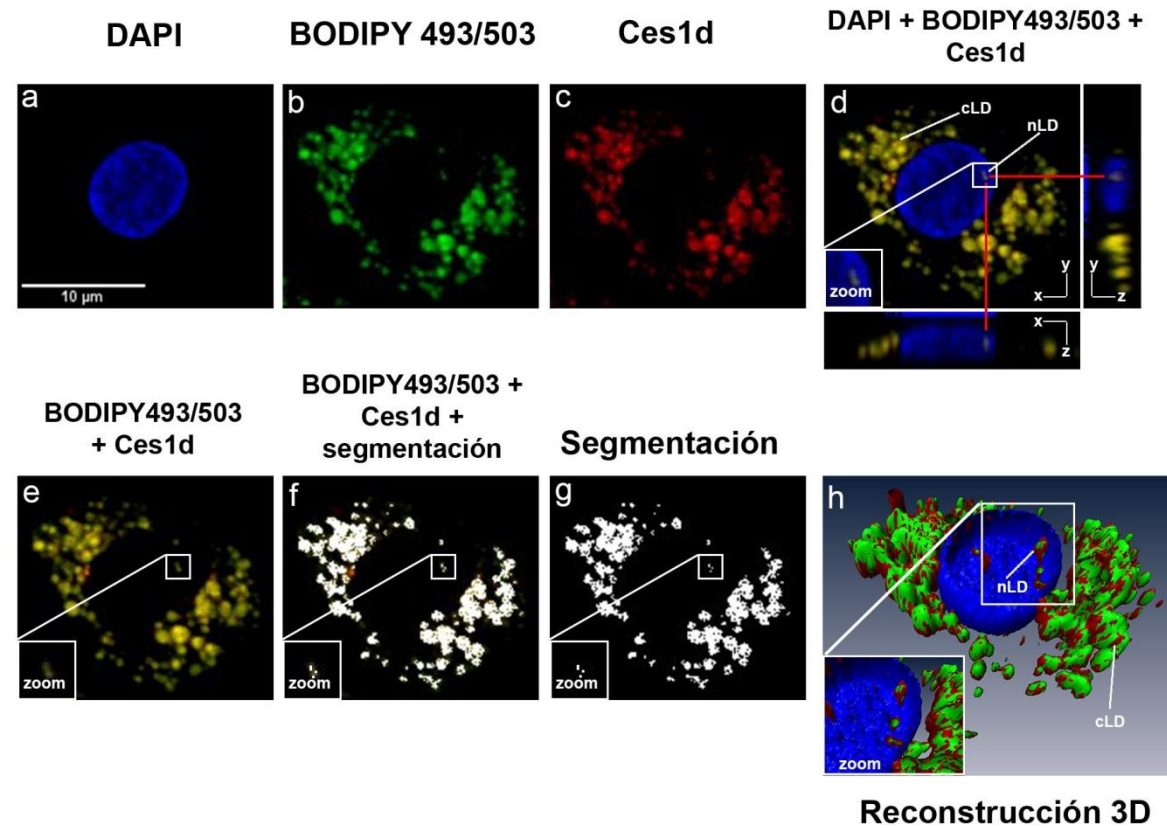
La colocalización se cuantificó mediante el coeficiente de Pearson, y se obtuvieron tanto a las 48 h como a las 72 h post tratamiento con AO valores cercanos a 1, indicando una casi total colocalización. Por su parte, los coeficientes  $M_1$  y  $M_2$  también presentaron valores cercanos a 1, lo que demuestra que existe una colocalización alta entre ambos fluoróforos. Ambos resultados en los coeficientes se corresponden con los valores obtenidos en la condición AO400, indicando que la proteína se encuentra en prácticamente su totalidad colocalizando con las nLD y cLD, y no dispersa en el citosol ni el núcleo celular.

### **Conclusión (5.4.2.)**

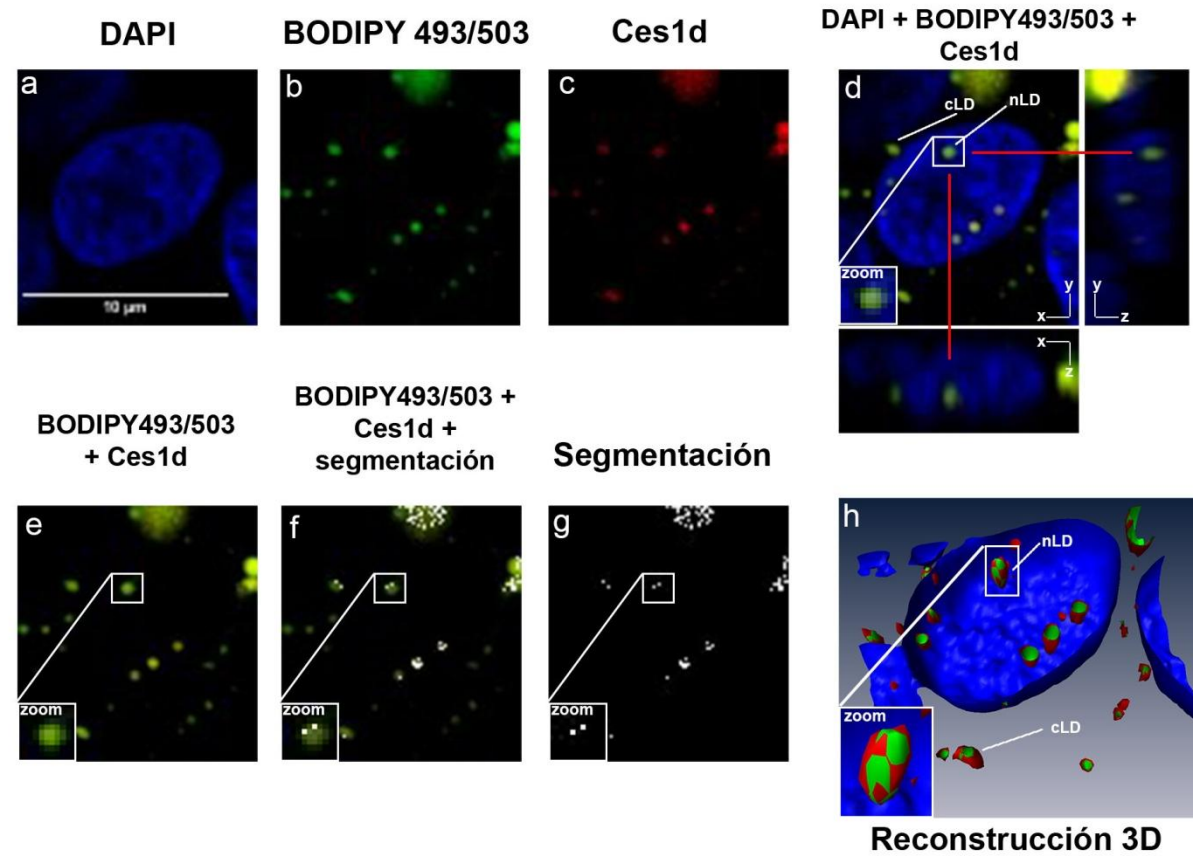
En conclusión, el AO determina un aumento en el tamaño de las nLD y cLD, y provoca que la carboxilesterasa transloque masivamente desde el citosol y la matriz nuclear, donde se encuentra dispersa en la condición control, a las respectivas LD.

La eliminación del AO del medio de incubación provoca una disminución en el tamaño de las nLD y cLD por lipólisis y posible oxidación de los LN (TAG, C y CE) (Sección 4.4.2. *El efecto del AO es reversible*), donde participaría la carboxilesterasa presente en las mismas. Si bien a las 72 h post tratamiento con AO se restablece la composición lipídica celular de la condición control, la carboxilesterasa permanece localizada en las LD y no dispersa en el citosol ni el núcleo celular.

Por lo tanto, la carboxilesterasa posee un activo rol en la dinámica de las nLD y cLD en respuesta a estímulos externos.



**Figura 33. Carboxilesterasa en nLD post tratamiento con AO (48 h).** Análisis por inmunofluorescencia de células HepG2 tratadas por 24 h con AO 400  $\mu\text{M}$  e incubadas post tratamiento durante 48 h en ausencia del mismo. En rojo se observa la fluorescencia debida a la carboxilesterasa, en azul DAPI y en verde BODIPY 493/503. En el recuadro se marca la presencia de nLD (zoom).



**Figura 34. Carboxilesterasa en nLD post tratamiento con AO (72 h).** Análisis por inmunofluorescencia de células HepG2 tratadas por 24 h con AO 400  $\mu$ M e incubadas post tratamiento durante 72 h en ausencia del mismo. En rojo se observa la fluorescencia debida a la carboxilesterasa, en azul DAPI y en verde BODIPY 493/503. En el recuadro se marca la presencia de nLD (zoom).

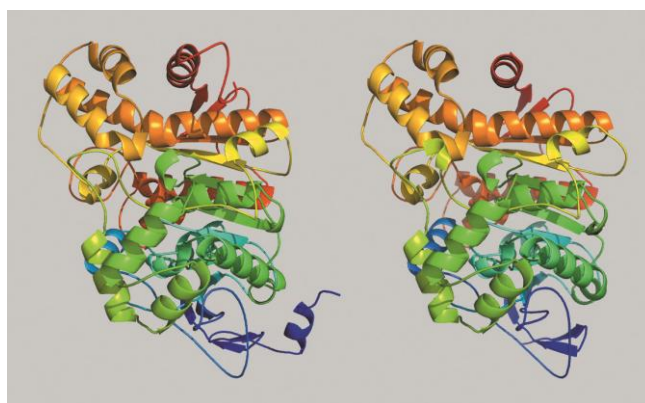
### 5.4.3. Análisis *in silico* de Ces1d de rata

Considerando que hasta el momento la información disponible sobre la enzima Ces1d de rata es escasa, y que no se conoce su estructura tridimensional ya que la proteína no ha sido cristalizada, el siguiente objetivo fue realizar un modelado por homología de su estructura terciaria. Se utilizó como molde el ortólogo humano de Ces1d de rata, la enzima CES1, que es una proteína que está ampliamente estudiada [143]. Con este fin se evaluó la siguiente hipótesis:

*La estructura terciaria de Ces1d de rata es semejante a la estructura terciaria de CES1 de humano*

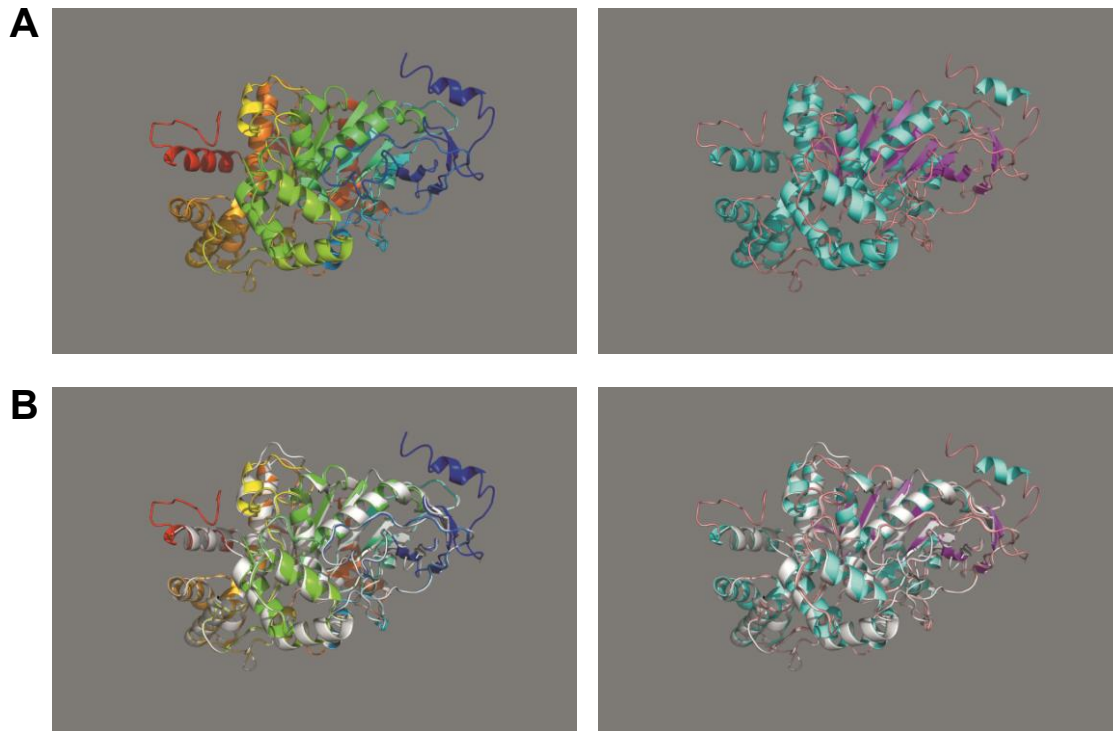
En la [Figura 35](#) podemos observar que la estructura terciaria predicha para Ces1d de rata presenta una gran similitud con la estructura terciaria de CES1 de humano. Por su parte, en la [Figura 36](#) podemos observar que la estructura predicha para Ces1d correlaciona muy bien con la estructura de la proteína propuesta que se utilizó como molde (CES1 de humano). El 95% de los residuos fueron modelados con más de un 90% de confianza ([Figura 37](#)).

La secuencia aminoacídica de Ces1d de rata contiene 565 residuos, en tanto que CES1 de humano contiene 567 residuos. Las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas comparten un 80% de identidad.

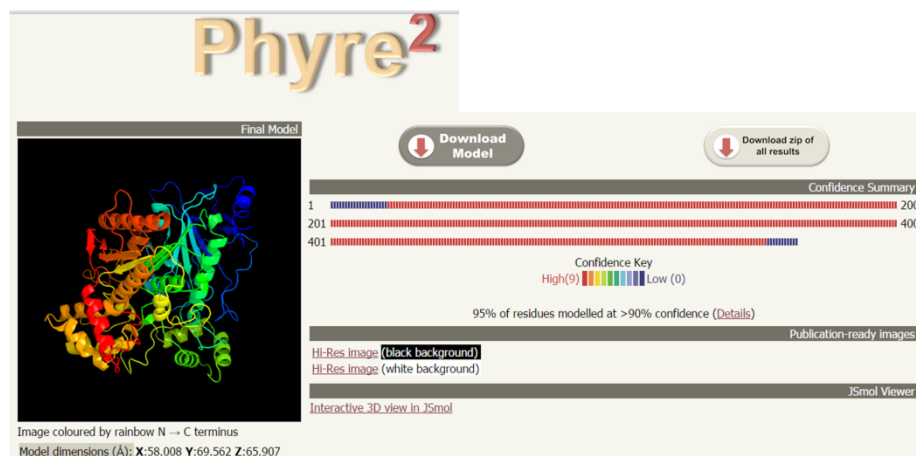


**Figura 35. Modelado por homología de Ces1d de rata.** Estructura terciaria de CES1 de humano (derecha) y modelo predicho de la estructura terciaria de Ces1d de rata (izquierda). Se utilizó como molde la estructura de CES1 de humano determinada por Bencharit et al. [143]. La estructura terciaria predicha para Ces1d de rata se obtuvo usando el sitio web Phyre<sup>2</sup>. El código de colores de arcoíris describe las estructuras 3-D desde el extremo N-terminal (azul) hasta el extremo C-terminal (rojo).





**Figura 36. Comparación entre el modelo de Ces1d de rata y la estructura terciaria de CES1 de humano. A)** Modelo predicho de la estructura 3-D de Ces1d de rata. A la izquierda, el código de colores describe el modelo 3-D desde el extremo N-terminal (azul) hasta el extremo C-terminal (rojo). A la derecha, se utilizó un código de colores que representan:  $\alpha$ -hélice (cian) y hoja plegada- $\beta$  (fucsia). **B)** Superposición de la estructura terciaria de CES1 de humano (blanco) con el modelo predicho de la estructura 3-D de Ces1d de rata (colores en arcoíris, izquierda, y colores cian, fucsia y rosa, derecha).

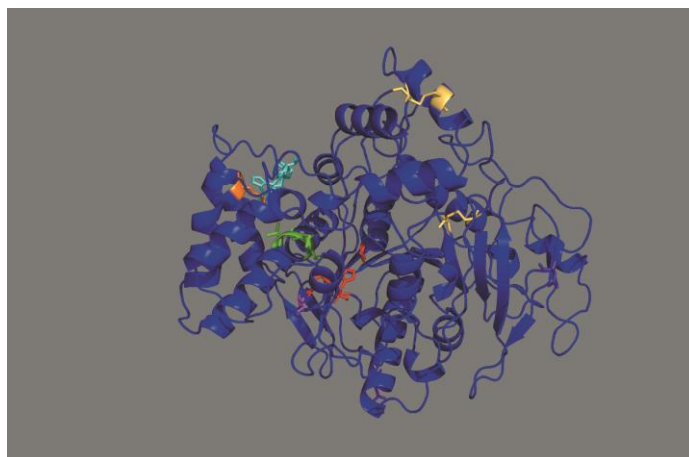


**Figura 37. Modelado de la estructura terciaria de Ces1d de rata.** El modelado de la estructura 3-D de Ces1d de rata se realizó a través del sitio web Phyre<sup>2</sup>. En la secuencia (a la derecha) se representa en rojo el segmento que se modeló con un alto grado de confianza, y en azul, los segmentos modelados “*ab initio*”, y por lo tanto, con una baja confianza.



**Figura 38. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de Ces1d de rata y CES1 de humano.** Se utilizó el servidor EMBOSS Needle con los parámetros por defecto para el alineamiento. Se obtuvo una identidad de secuencia de 76.8%; con un 2.4% de regiones no alineadas (*gaps*). | muestra residuos idénticos entre Ces1d y CES1; : muestra residuos con un alto nivel de similitud; . muestra residuos con bajo nivel de similitud. Los guiones indican *gaps*. Resaltado en rojo se muestran los residuos que constituyen la triada catalítica (Ser, Glu e His). El *side door* (verde), *Z-site* (fucsia) y *gate* (verde oliva) se muestran también resaltados en color. El resaltado violeta muestra los sitios de N-glicosilación, y el amarillo, los puentes disulfuro. En letras rojas se muestran los residuos del péptido señal N-terminal y del extremo C-terminal.

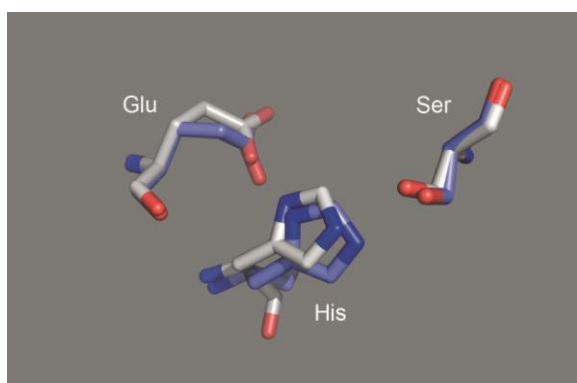
Species	Position	Sequence	Position
Ces1d rata	1	MRLYPLVLW-----FLAACTAWGYPPSSPPVVTNVKGKVLGKYVNLGEGA	44
CES1 humano	1	-----MWLRAFLILATLSASAAGWHPSSPPVVDTVHGKVLGKFVSLEGEA	44
Ces1d rata	45	QPVAVFLGIPFAKPPGLSLRFAPPQPAEPWNFVKTTSYPPMCSQDAVGG	94
CES1 humano	45	QPVAIFLGIPIFAKPPGLPLRFTPPQPAEPWFSVKATSYPPMCTQDPKAG	94
Ces1d rata	95	QVLSELFTNRKENIPLQFSEDCLYLNVYTPADLTKNRLPVMVWIHGGGL	144
CES1 humano	95	QLSELFTNRKENIPLKLSSEDCLYLNIYTPADLTKKNRLPVMVWIHGGGL	144
Ces1d rata	145	VVGASTYDQGVLSAHENVVVVTIQYRLGIWGFSTGDEHSQGNWGHLDQ	194
CES1 humano	145	MVGAASTYDGLALAAHENVVVVTIQYRLGIWGFSTGDEHSRGNWGHLDQ	194
Ces1d rata	195	VAALHWVQDNIANFGGNPGSVTIFGESAGGFSVSALVLSPLAKNLFHRAI	244
CES1 humano	195	VAALRWVQDNIASFGGNPGSVTIFGESAGGESVSVLVLSPLAKNLFHRAI	244
Ces1d rata	245	SESGVVLTSALITT-DSKPIANLIATLSGCKTTTSAVMVHCLRQKTEDEL	293
CES1 humano	245	SESGVALTSVLVKKGDKVPLAEQIAITAGCKTTTSAVMVHCLRQKTEDEL	294
Ces1d rata	294	LETSLKLNLFKDLLGNPKESYPFLPTVIDGVLPKTPEEILAEKSFNTV	343
CES1 humano	295	LETTLMKMFSLSDLQGDPPRESQPLLGTVIDGMLLLKTPEELQAERNFHTV	344
Ces1d rata	344	PYIVGINKQEFQFWIIP-TLMGYPLSEGKLDQKTAKSLLWKSYP TLKISEK	392
CES1 humano	345	PYMGVINKQEFQFWLIPQLMSYPLSEGQLDQKTAMSLLWKSYP LVCIAKE	394
Ces1d rata	393	MIPVVAEKYFGGTDDPAKRKDLFQDLVADVMPGVPSVMVSRSHRDAGAPT	442
CES1 humano	395	LIPEATEKYLGGTDDTVKKKDLFLDLIADVMPGVPSVIVARNHRDAGAPT	444
Ces1d rata	443	FMYEFEYRPSFVSAMRPKTVIGDGDGELFSVFGSPFLKDGASEEETLSK	492
CES1 humano	445	YMYEFQYRPSFSDDMKPKTVIGDGDGELFSVFGAPFLKEGASEEEIRLSK	494
Ces1d rata	493	MVMKYWANFARNGNPNGGGLPHWPEYDQKEGYLKIGASTQAAQRLKDKVEV	542
CES1 humano	495	MVMKFWANFARNGNPNGEGLPHWPEYNQKEGYLQIGANTQAAQKLKDKVEV	544
Ces1d rata	543	AFWSELAKAAAEESPHWKHVEL565	
CES1 humano	545	AFWTNLAKKAVEKPPOTEHIEL567	



**Figura 39. Residuos clave en el modelo predicho de la estructura terciaria de Ces1d de rata.** Se muestran los sitios de interés mediante diferentes colores: triada catalítica (rojo), *side door* (verde), *Z-site* (fucsia), *gate* (naranja), sitios de glicosilación (violeta), puentes disulfuro (amarillo) y extremo C-terminal (cian).

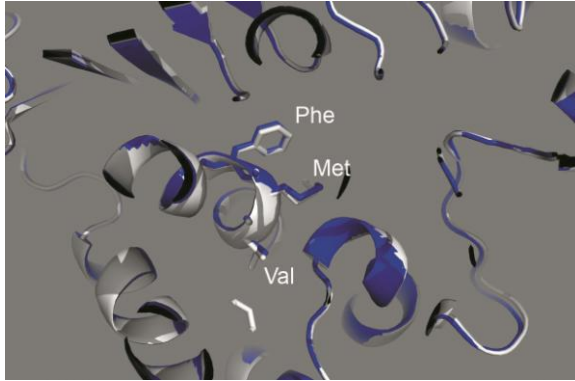
Se han identificado en CES1 de humano tres sitios principales de unión a ligando: la triada catalítica, el *side door*, y el *Z-site*, donde se unen sustratos, ácidos grasos, y análogos de colesterol, respectivamente; y un sitio denominado *gate*, que facilita la liberación de los productos luego de la catálisis [143]–[145].

La triada catalítica, altamente conservada entre la familia de las carboxilesterasas [146]–[148], está constituida por los residuos Ser-221, Glu-354 e His-468 en CES1 de humano [149]. El alineamiento de secuencias muestra que estos residuos están conservados en Ces1d de rata (Figura 38). Dichos resultados se condicen con datos de bibliografía [150]. Como se muestra en la Figura 40 en el modelo predicho de Ces1d de rata los residuos que constituyen la triada catalítica (Ser-221, Glu-353 e His-466) solapan casi perfectamente con los correspondientes residuos pertenecientes a CES1 de humano.



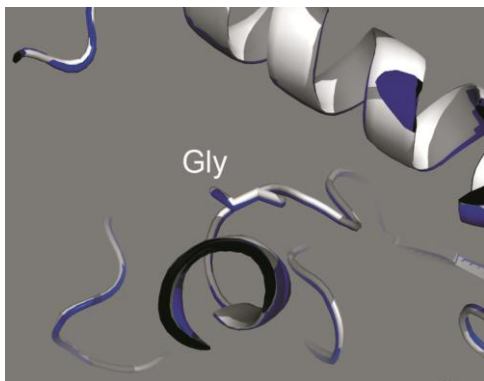
**Figura 40. Triada catalítica.** Disposición espacial de los residuos que constituyen la triada catalítica. En azul se muestran los residuos correspondientes al modelo predicho de la estructura 3-D de Ces1d de rata, y en blanco, los residuos de la estructura terciaria de CES1 de humano.

El *side door* identificado en CES1 de humano está constituido por los residuos Val-424;Met-425;Phe-426 [143], [144], en tanto que presentaría la secuencia Val-422;Met-423;Phe-424 (Figura 38) en Ces1d de rata (Figura 41). Es interesante señalar que en la estructura predicha de Ces1d de rata este importante dominio involucrado en la actividad catalítica de la enzima se solapa perfectamente con el de la proteína CES1 de humano que ha sido determinado por cristalografía [143], [144].



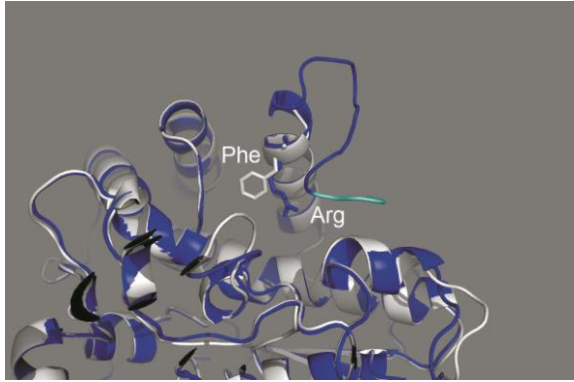
**Figura 41. Side door.** Disposición espacial de los residuos que constituyen el *side door*. En azul se muestran los residuos y el modelo predicho de la estructura 3-D de Ces1d de rata, y en blanco, la estructura terciaria de CES1 de humano.

El *Z-site*, constituido por el residuo Gly-356 en CES1 de humano [143], [144], según el alineamiento de secuencias (Figura 38) correspondería al residuo Gly-355 en Ces1d de rata. En el modelo predicho de Ces1d de rata se puede observar que existe una correspondencia casi perfecta con el residuo *Z-site* en CES1 de humano (Figura 42).



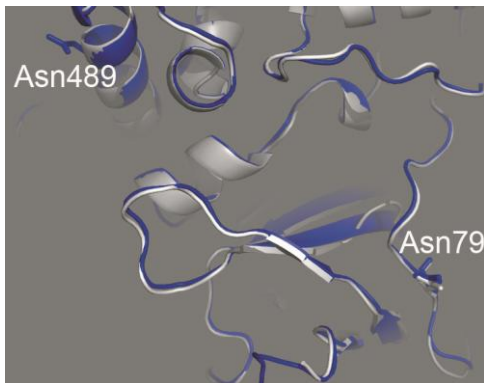
**Figura 42. Z-site.** Disposición espacial de los residuos que constituyen el *Z-site*. En azul se muestran los residuos y el modelo predicho de la estructura 3-D de Ces1d de rata, y en blanco, la estructura terciaria de CES1 de humano.

El residuo *gate* corresponde a Phe-551 en CES1 de humano [151]. Según la Figura 38, en dicha posición de la secuencia de Ces1d de rata se encuentra el residuo Arg-549 (Figura 43). Es interesante resaltar que Arg es un residuo básico y cargado positivamente, mientras que Phe es un residuo no polar.



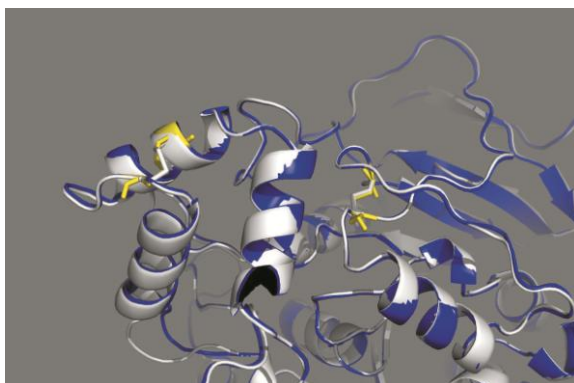
**Figura 43. Gate.** Disposición espacial de los residuos que constituyen el *gate*. En azul se muestran los residuos y el modelo predicho de la estructura 3-D de Ces1d de rata, y en blanco, la estructura terciaria de CES1 de humano.

En CES1 de humano se detectó un solo sitio de glicosilación en Asn-79 [143], [144], en tanto que en Ces1d de rata se identificaron dos potenciales sitios, Asn-79 y Ans-489 [150] (Figura 38 y Figura 44).



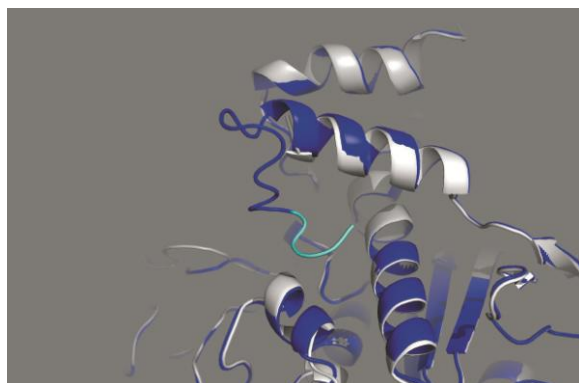
**Figura 44. Sitios de glicosilación.** Disposición espacial de los residuos de glicosilación. En azul se muestran los residuos y el modelo predicho de la estructura 3-D de Ces1d de rata, y en blanco, la estructura terciaria de CES1 de humano.

Por su parte, en la proteína cristalizada CES1 de humano se detectaron dos puentes disulfuro, uno entre Cys-87 y Cys-116, y otro entre Cys-274 y Cys-285 [144]. En Ces1d de rata también se detectaron dos puentes disulfuro [150], uno entre los residuos Cys-87 y Cys-116, y otro entre los residuos Cys-273 y Cys-284 (Figura 38 y Figura 45).



**Figura 45. Puentes disulfuro.** Disposición espacial de los residuos que constituyen los puentes disulfuro (amarillo). En azul se muestra el modelo predicho de la estructura 3-D de Ces1d de rata, y en blanco, la estructura terciaria de CES1 de humano.

Las secuencias N- y C-terminal de ambas proteínas son diferentes. El extremo N-terminal posee 18 residuos [131], [152] [150], y el C-terminal una secuencia de retención en el ER HIEL y HVEL, en CES1 de humano y Ces1d de rata, respectivamente [153] (Figura 38 y Figura 46).



**Figura 46. Secuencia C-terminal.**

Disposición espacial de los residuos que constituyen el extremo C-terminal de la secuencia de Ces1d de rata (cian) y de CES1 de humano (blanco). En azul se muestra el modelo predicho de la estructura 3-D de Ces1d de rata, y en blanco, la estructura terciaria de CES1 de humano.

### Conclusión (5.4.3.)

La estructura tridimensional predicha para Ces1d de rata presenta una elevada similitud con la estructura 3-D del ortólogo humano CES1, ya que el 95% de los residuos de Ces1d fueron modelados con más de un 90% de confianza. Por lo tanto, proponemos que la estructura secundaria y terciaria de Ces1d de rata sería similar a la reportada previamente para CES1 de humano.

En este modelo de la estructura terciaria de Ces1d de rata se identificaron y localizaron potenciales residuos clave que contribuirían a la actividad catalítica, localización subcelular y estructura de la proteína. En particular, la orientación espacial de aquellos residuos que participarían en la actividad catalítica (triada catalítica, *side door* y *Z-site*) de Ces1d de rata se correlaciona casi perfectamente con los previamente identificados en CES1 de humano.

## 5.5. DISCUSIÓN

### Hipótesis

*1) Las proteínas de la monocapa de las nLD están involucradas en el metabolismo lipídico y en los sistemas de transducción de señales nucleares. Ya sea como componentes estructurales, enzimas, factores de transcripción y/o proteínas de transporte.*

### Proteínas de las nLD

Habiendo determinado que las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico, coordinado y regulado con el de las cLD en respuesta al AO, el siguiente objetivo fue dilucidar los mecanismos involucrados en este proceso. Este objetivo se abordó utilizando como herramienta metodológica el análisis de proteómica de las nLD por espectrometría de masas. Las proteínas presentes en las nLD permiten inferir las rutas metabólicas en las que éstas están involucradas.

Se identificaron hnRNP en todas las muestras de nLD analizadas por proteómica, ya sea por GeLC-MS como por MALDI-TOF MS. Está descrito que las hnRNP pueden unirse a la actina en el núcleo formando complejos nucleares que participan en el transporte nucleoplásmico [154]–[156]. Otra de las proteínas identificadas asociada a las nLD es la actina (protocolo B), que estaría interaccionando con las gotas lipídicas en forma débil, dado que no se la identificó en la muestra de nLD tratadas con NaCl (protocolo C). La actina y la miosina ya han sido descritas en el núcleo celular [21]. En base a esos resultados, proponemos que las nLD no serían estructuras inmóviles dentro del núcleo, sino que podrían desplazarse mediante un mecanismo de movilización que involucraría a las hnRNP, actina y miosina. Las nLD actuarían como un sistema de *delivery* y/o de reclutamiento de lípidos y proteínas en las distintas zonas del núcleo.

En las nLD también fueron identificadas *heat shock proteins* mediante GeLC-MS y MALDI-TOF MS. Está demostrado que la proteína Hsp70 (*Heat shock protein 70*) es una proteína constituyente de las cLD, y que además, bajo estrés térmico transloca desde el citosol hacia la superficie de las cLD. Se propone que una de las



funciones de esta *heat shock protein* sería la de preservar la integridad estructural de las LD y de las proteínas asociadas [157].

Otra de las proteínas identificadas en todas las muestras de nLD analizadas por proteómica son las histonas. Si bien las histonas son proteínas nucleares, han sido detectadas en cLD de varios tipos celulares incluyendo *C. elegans*, embriones de mosca, cLD de polillas, y en mamíferos, en células  $\beta$  de los islotes de Langerhans, en músculo y en hígado de ratón [129], [158]–[163]. Ha sido demostrado además, que las histonas (H2A y H2B) se unen a las cLD mediante interacciones con proteínas específicas de anclaje (proteína Jabba) presentes en la superficie de las cLD [164], y que estas histonas se liberan al citosol en respuesta a una infección bacteriana [129], contribuyendo a la inmunidad innata de las células. Otros estudios demuestran que en embriones de *Drosophila* que carecen de histonas asociadas a las LD, las bacterias crecen rápidamente; en tanto que, en embriones que poseen LD con histonas asociadas, las bacterias mueren [129]. Por su parte, existen evidencias de que en mutantes Jabba se produce una sobreacumulación de histonas en el núcleo celular, un evento asociado al daño del ADN [165]. Las células presentan mecanismos que les permiten detectar la acumulación de histonas libres e inducir su degradación en el proteosoma [166]. Esto no ocurre en embriones en condiciones control, sugiriendo que las LD pueden alojar estas histonas producidas en exceso previniendo su entrada desregulada al núcleo. Por lo tanto, las nLD funcionarían como un reservorio de histonas dentro del núcleo, donde quedarían protegidas de su degradación en el proteosoma nuclear [167].

Ces1d fue la única proteína del metabolismo lipídico que se identificó por proteómica en el análisis de las proteínas de las nLD purificadas (Protocolo B). Ces1d es una enzima de la familia de las carboxilesterasas (carboxil-éster hidrolasas) (3.1.1.1) muy poco estudiada, que ha sido descrita con localización citosólica, en particular asociada al ER [130], [131] y a las cLD [131], [133], [134].

Las LD están ampliamente distribuidas en todos los seres vivos. En particular, las bacterias *Rhodococcus* poseen cLD en su citoplasma que responden a estímulos internos y externos modificando su número y tamaño [121], [122]. Sin embargo, las proteínas estructurales de la familia PAT que son las mayoritarias y marcadoras de las cLD en organismos eucariotas, no se encuentran presentes en estas bacterias.

La proteína mayoritaria de las cLD en estas bacterias es la proteína ro02104, cuya estructura es similar a las apo-proteínas presentes en las lipoproteínas plasmáticas de mamíferos. Se propone que esta proteína tendría en las cLD un rol estructural equivalente al de las proteínas de la familia PAT. Se ha demostrado que cuando se muta ro02104, las bacterias adquieren gotas lipídicas gigantes, sugiriendo que esta proteína impediría la fusión de cLD en condiciones normales. Mediante estudios de proteómica en *Rhodococcus* se han identificado 3 *SNARE-like proteins* [121] que estarían implicadas en los procesos de fusión de las cLD, sugiriendo que estas proteínas están conservadas evolutivamente a diferencia de las proteínas estructurales PAT.

Mediante estudios de proteómica no hemos identificado en las nLD proteínas estructurales de la familia PAT, confirmando resultados previos de laboratorio en los que mediante estudios de western blot, tampoco se pudo identificar a PLIN1 en el núcleo ni en la matriz nuclear de hígado de rata [18]. Por lo tanto, la ausencia de proteínas PAT tanto en las nLD como en las cLD de las bacterias *Rhodococcus* podrían ser datos que abalarían un origen endosimbiótico del núcleo en las células eucariotas. Según esta teoría, una eubacteria habría actuado como hospedadora de una arqueobacteria endosimbiótica, que se habría transformado en el núcleo de la célula hospedadora [168], conservando algunas de las características celulares propias, como por ejemplo la ausencia de proteínas PAT en sus LD. Aceptando esta hipótesis como válida, las nLD tendrían un origen nuclear, independiente de las cLD, o bien, se originarían en el citoplasma y perderían posteriormente las proteínas PAT en su tránsito hacia el núcleo. Para avalar cualquiera de estas dos últimas hipótesis planteadas hace falta un riguroso trabajo experimental.

Muchas de las proteínas identificadas en la banda  $\alpha$  (protocolo A) (EHP, IMB1, MATR3 y EF1A1, PDIA4, GRP78 y OGT1) no se encontraron presentes en las nLD purificadas (protocolos B y C), por lo tanto, es posible que sean proteínas nucleares que no formen parte de las nLD y que pertenezcan a estructuras o moléculas con las que las nLD interaccionarían.

Podemos suponer que la importina (IMB1), presente en la banda  $\alpha$ , pudo haber participado en el ingreso al núcleo, a través del complejo de poro nuclear, de proteínas de las nLD (con señal de localización nuclear) y haber quedado adherida a las gotas. Por otra parte, las importinas también podrían participar en el ingreso al



núcleo de LD muy pequeñas provenientes del citosol. Teniendo en cuenta que las importinas fueron identificadas en la banda  $\alpha$  (protocolo A) y no en las muestras de nLD purificadas (protocolos B y C), podemos considerar que la presencia de las importinas en las nLD es transitoria y no se encontrarían acumuladas en las mismas.

La glicosilación de proteínas es un mecanismo post-traducciona que se desarrolla en el citoplasma (RE, Golgi y mitocondrias) y en el núcleo celular [169]. Está documentado que en el núcleo OGT1 participa en la glicosilación de proteínas tales como la histona H2B, proteínas que regulan los genes del *clock* involucrados en los ritmos circadianos celulares [170] y proteínas del poro nuclear [171], entre otras. Se propone que OGT1 ingresaría al núcleo vía el sistema del transporte del poro nuclear asociado con la proteína importina [172]. Teniendo en cuenta que la importina también fue identificada en la banda  $\alpha$ , podemos proponer entonces que el proceso de glicosilación descrito en el núcleo se desarrollaría en las nLD donde participaría OGT1 que ingresa al mismo vía importina a través del poro nuclear.

Si bien el metabolismo lipídico nuclear es muy activo, a la fecha la  $\beta$ -oxidación lipídica no ha sido descrita en el núcleo. Sin embargo de haber  $\beta$ -oxidación lipídica en el núcleo, es probable que la ECHP, que es una de las enzimas de este proceso y que fue identificada en la banda  $\alpha$  y no en las nLD purificadas, pertenezca a otras estructuras nucleares o moléculas con las que las nLD interaccionarían.

Por lo tanto, las proteínas identificadas por proteómica en las nLD podrían estar participando en forma activa en procesos nucleares y/o resguardadas en un reservorio en el que no quedan expuestas a la proteólisis nuclear.

### **Carboxilesterasa 1d**

Las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) son una gran familia de esterasas de ácidos carboxílicos (EC 3.1.1) altamente conservadas y con amplia especificidad, que presentan una gran diversidad y pueden ser encontradas en prácticamente todas las especies [173]. Estas enzimas son una clase de serina-hidrolasas que catalizan eficientemente la hidrólisis de enlaces ésteres y amidas en una amplia variedad de moléculas.

Las carboxilesterasas juegan un rol crítico en el metabolismo lipídico [97] (participan en el ensamblaje de las VLDL) y están involucradas en la detoxificación de drogas [97], [135] (hidrolizan drogas que contienen uniones éster y amida, tales como la cocaína y heroína) y xenobióticos [174] como insecticidas [175], [176].

Las carboxilesterasas típicas de mamíferos son glicoproteínas [146], [177] con masas moleculares en el rango de 57 a 66 kDa. A pesar de que forman multímeros, la agregación aparentemente no es esencial para su actividad catalítica [146], [178]. Las carboxilesterasas son miembros de la superfamilia de las serin-esterasas, caracterizadas por 3 dominios de sitio activo putativo altamente conservado, que constituyen la tríada catalítica (Ser, His, y un residuo ácido) [146].

La actividad carboxilesterasa está ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos [179]. Sin embargo, el número total de genes de carboxilesterasas varía marcadamente de especie a especie.

Según la nomenclatura propuesta [179], los genes de carboxilesterasas de humano se designan como “CES” y aquellos de rata y ratón como “Ces”, seguidos por el número de familia (por ejemplo, *Ces1*). En genomas de rata y ratón, cuando se identifican múltiples genes de una familia de genes se agrega una letra al final, luego del número (por ejemplo, *Ces1d*).

En el genoma de rata, existe una gran similaridad en la secuencia de las 5 familias de *Ces*. Dentro de la familia *Ces1* eventos de duplicación génica han generado 5 genes que se localizan *in tandem* dentro de un segmento de 201-kb del cromosoma 19 de rata, con un tamaño de gen promedio de 33 kb.

El gen de rata *Ces1d* (38-kb) (también llamado *Ces3*) codifica para la enzima Carboxilesterasa 1d, también conocida como Carboxilesterasa 3 (*Ces3*), la cual contiene 565 residuos, y posee actividad etil-éster-ácido-graso sintasa (FAEE sintasa, [136], [137], esterol-esterasa [138], retinil-éster-hidrolasa [139], y triacilglicerol-hidrolasa [140].

Esta carboxilesterasa se encuentra altamente expresada en hígado y tejido adiposo, y también se expresa en menor proporción en intestino delgado, corazón y riñón [180].

### Localización nuclear de la carboxilesterasa

Hemos demostrado por primera vez la localización de la carboxilesterasa en condiciones fisiológicas dentro del núcleo celular, distribuida en la matriz nuclear y asociada a las nLD. Resta determinar la localización precisa de la proteína en la matriz y, teniendo en cuenta que la carboxilesterasa sería una proteína de membrana, es probable que esté asociada a la MNI. Así mismo, hemos determinado la topología celular de la enzima, y en condiciones fisiológicas, la carboxilesterasa se localiza mayoritariamente en el citosol, y en baja proporción en el núcleo celular. Por su parte, dentro del citosol colocaliza con las cLD en una baja proporción, ya que también se encuentra dispersa, colocalizando posiblemente con el ER y/o con otras estructuras celulares. Estos resultados concuerdan con la bibliografía, donde se demuestra que la carboxilesterasa está en el lumen del ER [132], y asociada a las cLD [133].

Por lo tanto, teniendo en cuenta que la localización nuclear de la carboxilesterasa no es exclusiva de las nLD, ya que también se encuentra dispersa en la matriz, esta proteína no es una candidata válida para ser elegida como marcadora de las gotas lipídicas nucleares.

La carboxilesterasa posee un activo rol en la dinámica de las nLD y de las cLD. Al mismo tiempo que aumenta el número, tamaño y contenido lipídico (efecto del AO) de las nLD y cLD, la carboxilesterasa transloca masivamente a la superficie de las LD. Estos resultados están abalados por estudios previos en macrófagos humanos que muestran que la carboxilesterasa transloca a las cLD en respuesta al tratamiento con un estímulo externo (sobrecarga de lípidos) [142].

Cuando se elimina el estímulo externo (-AO) se revierten los incrementos generados, y disminuye el tamaño de las nLD y cLD por procesos de fisión y por una disminución en el contenido total de los LN, como respuesta a un aumento de las rutas catabólicas. La carboxilesterasa en la superficie de las nLD y cLD hidroliza los TAG y CE, y determina así una disminución en el contenido celular de los mismos. Esta enzima actúa también sobre los MAG [181], generando glicerol y FA. Por su parte, los DAG generados podrían ser sustratos de la DAGL (diacilglicérido lipasa), una enzima descrita en el núcleo celular que participa en el metabolismo del PA (ácido fosfatídico) a MAG [41], [42]. Se ha demostrado que los componentes de esta

vía están involucrados en los mecanismos de señalización de los procesos de envejecimiento.

La actividad enzimática de la carboxilesterasa sobre los LN de las nLD tratadas con AO, no solo permite revertir el fenotipo morfológico al de la condición control, sino que además está generando localmente moléculas que además de ser oxidadas pueden estar actuando como segundos mensajeros lipídicos regulando la homeostasis lipídica nuclear y/o celular. Los FA liberados producto de la actividad catalítica de la enzima se unirían a la FABP nuclear [182], ya que está demostrado que la FABP tiene un activo rol en la movilización de FA en la matriz nuclear [18]. Estos FA dentro de núcleo podrían unirse a factores de transcripción como los PPAR [44], activarse a acil-CoA por la ACSL [183] y re-esterificarse, ser  $\beta$ -oxidados y/o salir del núcleo hacia al citosol.

Teniendo en cuenta que por efecto del AO la carboxilesterasa transloca masivamente a la superficie de las nLD y cLD en forma temprana, podríamos considerar la localización de la carboxilesterasa en las LD como un blanco terapéutico en el síndrome metabólico, en el que una de las características distintivas es el aumento de los TAG, y el concomitante aumento en el tamaño de las LD.

Está descripto que por efecto del AO la CCT $\alpha$ , que participa en la síntesis de PC, transloca a la superficie de las cLD [184]. Teniendo en cuenta que la CCT $\alpha$  se encuentra en el núcleo, y que transloca entre la MNI y los *spekles* [15], resta determinar si en el núcleo la CCT $\alpha$  transloca a la superficie de las nLD en respuesta al AO, aportando LP a la monocapa de las LD.

### **Análisis *in silico* de Ces1d de rata**

El modelo predicho de la estructura terciara de Ces1d de rata y el alineamiento de secuencias permitieron localizar potenciales residuos clave que contribuirían a la actividad catalítica, localización subcelular y estructura de la proteína. Teniendo en cuenta que Ces1d de rata aun no ha sido cristalizada, mediante este estudio se pudo predecir por primera vez la ubicación espacial de estos sitios de interés utilizando como molde su ortólogo humano CES1.

Los procesos en los que están involucrados algunos de estos sitios ya han sido estudiados en CES1 de humano. Las principales características de los sitios asociados a la actividad catalítica de la enzima se detallan a continuación:

- La *triada catalítica* en CES1 de humano yace en la base del sitio activo, que se encuentra aproximadamente en el centro de la proteína, el cual comprende un bolsillo largo flexible, y un bolsillo pequeño rígido. El sitio activo está delineado por una serie de residuos hidrofóbicos que rodean la triada catalítica, brindando un ambiente ideal para la hidrólisis de una gran cantidad de sustratos hidrofóbicos [143].
- El *Z-site* es capaz de unir moléculas análogas de colesterol, indicando un rol importante en el metabolismo lipídico, en términos del procesamiento de CE y otros sustratos endógenos. CES1 existe en un equilibrio de trímero-hexámero. La enzima utiliza la superficie del *Z-site* para formar el hexámero por unión de dos trímeros, por lo que el *Z-site* solo podrá unir ligandos cuando la enzima se encuentre en su forma de trímero [143]. La unión de estos ligandos al *Z-site* cambia el equilibrio hacia trímero, facilitando su acceso al sitio activo y promoviendo su catálisis [143].
- Se ha observado que la unión de palmitato al *side door* en CES1 de humano sugiere que uno de los residuos que constituyen este sitio, Met, es un residuo importante en la liberación de ácidos grasos luego de la hidrólisis de CE o acil-CoA [143]. Estos resultados se corresponden con lo observado por Wallace et al en el residuo equivalente del ortólogo Ces1d de rata [173]. Se ha propuesto que Phe, ubicado inmediatamente después de Met, induce un cambio conformacional en la estructura de la proteína que permite la liberación de los productos (como ácidos grasos) del sitio activo a través del *side door*.
- Se ha propuesto que el *gate*, ubicado cerca del C-terminal, puede funcionar como una válvula que permite la liberación de los productos desde el *side door*.

La secuencia señal N-terminal y el extremo C-terminal presentan diferencias entre Ces1d de rata y CES1 de humano. Según datos bibliográficos, el péptido señal N-terminal dirige a CES1 hacia el ER, y es removido posteriormente por enzimas

propias del ER [131], [152]. Por su parte, se ha propuesto que la secuencia C-terminal HVEL de Ces1d de rata funciona como una señal de retención del ER [153], al igual que la secuencia C-terminal HIEL de CES1 de humano [151]. Podríamos suponer que estas diferencias en los extremos de las secuencias de ambas proteínas se deben a que son enzimas de diferentes especies.

## **6. CONCLUSIONES FINALES**

Los lípidos en el núcleo, al igual que en el resto de la célula, son moléculas muy versátiles que poseen un activo metabolismo e importantes funciones biológicas que abarcan roles estructurales, energéticos, y en la regulación celular, en procesos de señalización actuando como segundos mensajeros.

Los lípidos nucleares se encuentran en dos localizaciones muy contrastantes, la envoltura nuclear, más fluida que el interior nuclear y compuesta de GPL, SL y C; y dentro del núcleo, en las nLD, donde se encuentran concentrados todos los TAG y CE nucleares, organizados en un core hidrofóbico rodeado de una monocapa de LP, C y proteínas asociadas. Existe además, un remanente de LP en la matriz nuclear formando complejos con la cromatina [36]. Los LP nucleares participan activamente como segundos mensajeros en diferentes vías de señalización que involucraran a GPL y SL [42], [185]. Los LP nucleares se caracterizan por contener mayoritariamente 20:4n-6 y 18:0 en sus especies moleculares, mientras que los LN poseen en su mayoría 16:0, 16:1n-7, 18:2n-6 y 18:1n-9 esterificados en sus moléculas [18], [38].

En este trabajo de tesis se estudió el metabolismo de las nLD y se determinó que las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico, que responde a estímulos celulares externos en forma reversible y coordinada con las cLD.

El metabolismo lipídico nuclear de LN está coordinado con el citosólico. Los LN celulares se localizan mayoritariamente en el citoplasma, en las cLD. Está documentado que las cLD participan en numerosos procesos celulares a través de interacciones con el RE y el Golgi (rutas anabólicas), con mitocondrias y peroxisomas (rutas catabólicas), con endosomas tempranos, caveolas y autofagosomas (vías endocíticas), VLDL y exosomas (vías exocíticas), parásitos y virus, y finalmente con el citoesqueleto, a través de microtúbulos y de proteínas motoras [60].

Los LN nucleares que se localizan y organizan en las nLD corresponden a una proporción muy baja de los LN celulares, pero están estratégicamente localizados dentro del núcleo habilitando un dominio hidrofóbico con características muy diferentes a las de las membranas nucleares y los demás dominios nucleares.

Las nLD estarían involucradas en la homeostasis lipídica, y en el interior nuclear servirían como un sistema buffer capaz de aportar o incorporar en forma



rápida proteínas y lípidos involucrados en vías de señalización, aportando ligandos (FA, DAG, etc.) para factores de transcripción, sustratos, y enzimas del metabolismo lipídico y de otros procesos que se desarrollan dentro del núcleo.

Las nLD no serían estructuras inmóviles nucleares sino que podrían desplazarse utilizando actina y miosina. Estas moléculas han sido descritas en el núcleo celular [21] y en particular, en este trabajo se ha demostrado que las nLD estarían asociadas a la actina nuclear, actuando así como un sistema de *delivery* y de recepción de lípidos y de proteínas dentro del núcleo.

Los procesos nucleares de señalización deben encenderse y apagarse, y las nLD podría actuar proveyendo FA, liberados a partir de la hidrólisis de sus lípidos, que movilizados unidos a la FABP, se unirían a factores de transcripción como los PPARs, y luego, finalizado el “encendido” el proceso se apagaría cuando los FA, liberados de los factores de transcripción, se esterifiquen en los lípidos de las nLD y/o de la membrana nuclear.

Las nLD, al igual que las cLD, podrían actuar como un reservorio nuclear de proteínas que serían resguardadas de su degradación en el proteosoma nuclear. Las proteínas en las nLD además de ser resguardadas, podrían estar en forma activa y dicha función ser acercada por el *delivery* de las nLD a diferentes dominios nucleares. En este trabajo se demostró que las nLD poseen o estarían en contacto con proteínas involucradas en los mecanismos de modificaciones postraduccionales de proteínas, que podrían desarrollarse en la propia nLD.

Si bien el metabolismo lipídico nuclear es muy activo, a la fecha la  $\beta$ -oxidación lipídica no ha sido descrita en el núcleo. Sin embargo de haber  $\beta$ -oxidación lipídica en el núcleo, es probable que la ECHP, que es una de las enzimas de este proceso que fue identificada en la banda  $\alpha$  y no en las nLD purificadas, pertenezca a otras estructuras nucleares o moléculas con las que las nLD interaccionarían aportando sustratos lipídicos y/o proteínas. Así mismo, teniendo en cuenta que en el subproteoma de las nLD se identificaron factores de transcripción, enzimas del ADN y factores de splicing, podemos suponer que estas proteínas serían propias de las nLD y/o serían aportadas por los dominios nucleares dónde se desarrollan estas funciones.

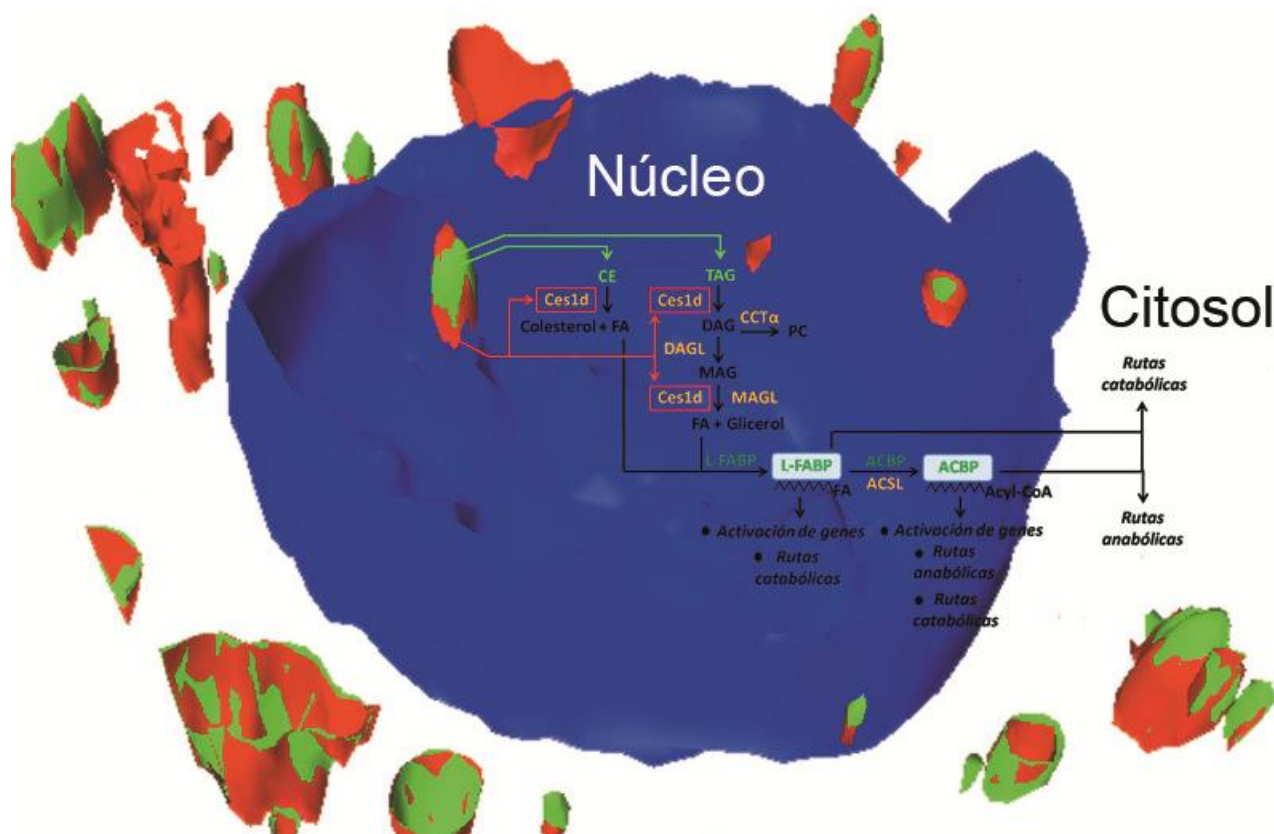
A partir de los resultados de esta tesis, es evidente que en el núcleo las nLD poseen un metabolismo muy activo y estarían en contacto estrecho con otros dominios nucleares, lo que resta identificar.

En este trabajo se demostró que las células frente al estímulo externo de AO responden activando las rutas anabólicas que determinan un aumento en el número y tamaño de las LD en las poblaciones de cLD y nLD, a través de mecanismos de incorporación de lípidos neutros sintetizados *de novo* y de fusión de gotas existentes de menor tamaño. Está descrito que el AO determina que la CCT $\alpha$ , involucrada en la síntesis de PC, en el citosol transloca a la superficie de las cLD [184]. Teniendo en cuenta que esta enzima también se localiza en el núcleo, y que transloca entre la MNI y los *speckles* en respuesta a estímulos [15], podemos suponer que en el núcleo la CCT $\alpha$  transloca a la superficie de las nLD en respuesta al AO, aportando así los LP de la monocapa necesarios para que aumente el tamaño de las nLD. El fenotipo anabólico desencadenado por el AO se revierte al eliminar el estímulo del medio y se activan entonces, los procesos catabólicos de la célula que involucran un mecanismo de fisión de gotas grandes en gotas de menor tamaño. Estos procesos catabólicos incluirían la lipólisis y posterior oxidación de los LN de las LD que disminuirían de tamaño por reducción de sus componentes. La Ces1d presente en las nLD y las cLD, posee un activo rol en este proceso, hidrolizando TAG, CE y MAG. En la hidrólisis de los DAG y MAG también podría participar la DAGL y la MAGL descrita previamente en el núcleo celular [41], [42]. Los FA liberados de la hidrólisis de los lípidos de las nLD por acción de la Ces1d, se unirían a la FABP en la matriz nuclear, y translocarían a sitios de  $\beta$ -oxidación nuclear y/o citosólicos, y finalmente serían oxidados. Así mismo, los FA liberados en la matriz nuclear podrían unirse como ligandos, a factores de transcripción nucleares y participar en la regulación de estos mismos procesos (Figura 47).

En presencia de AO el balance metabólico celular es positivo hacia las rutas anabólicas, y este hecho determina un aumento en el tamaño de las nLD y cLD debido al aumento celular de los LN que se localizan en el core de las LD.

Podemos considerar que el proceso catabólico que se desencadena en presencia de AO, y que determina un aumento de la concentración celular de especies reactivas de oxígeno (ROS) [107], se inicia con la translocación de la Ces1d desde el citosol y la matriz nuclear hacia las cLD y nLD, respectivamente. En

condiciones donde el metabolismo celular está regulado, la localización de la Ces1d en las cLD y nLD cuando se produce un aumento en el tamaño de las mismas, tendería a restablecer el fenotipo fisiológico.



**Figura 47. Mecanismo propuesto para el metabolismo de los LN (TAG y CE) presentes en el core de las nLD.**

Sería interesante determinar si en el síndrome metabólico humano la Ces1d transloca masivamente a las cLD y nLD en las células hepáticas como consecuencia de la esteatosis lipídica. De ser así, proponemos que la Ces1d y, en particular, los mecanismos involucrados en su localización intracelular podrían ser blancos terapéuticos para abordar las consecuencias del síndrome metabólico, ya que, a partir de los resultados presentados en este trabajo es evidente que no solo es importante la presencia de Ces1d en la célula, sino también su localización en las cLD y nLD para revertir el desbalance celular en el metabolismo lipídico.

Validando una de las hipótesis propuestas, la carboxilesterasa nuclear, y en particular la localizada en la monocapa de las nLD, está involucrada en el metabolismo lipídico y en los sistemas de transducción de señales, podría actuar

como una proteína estructural de la monocapa de las nLD, que posee actividad enzimática y que generaría ligandos de factores de transcripción localmente.

Habiendo demostrado que en el núcleo existen los procesos de fisión y fusión de nLD, podemos suponer que también deben existir las proteínas involucradas en estos procesos que hasta el momento no han sido descritas en el núcleo celular. Según datos bibliográficos, en los procesos de fusión de vesículas (bicapa), gotas lipídicas (monocapa) o bicapa y monocapa, están involucradas las proteínas SNARE, entre otras (*Sección 2.7.5. Rol del complejo proteico SNARE en la fusión de cLD*). Es interesante señalar, que en las bacterias que poseen cLD, bajo determinados estímulos ocurre la fusión de gotas lipídicas, y en este proceso estarían involucradas “proteínas tipo SNARE” (*SNARE-like proteins*) descritas por proteómica en estos organismos [121], [122]. Por lo tanto, las proteínas SNARE o “proteínas tipo SNARE” también podrían estar presentes en el núcleo y participar en la fusión de las nLD.

Podemos proponer que la composición lipídica y proteica de las nLD es diferente a la de las cLD, teniendo en cuenta que fue demostrado anteriormente que poseen distinta composición lipídica [18], y que por estudios de proteómica, en las nLD solo se identificó a la Carboxilesterasa como enzima del metabolismo lipídico. Con el estudio de proteómica realizado no podemos aseverar que en las nLD no estén presentes otras proteínas como la ATGL o HSL, entre otras, que sí están presentes en las cLD, pero podemos suponer que de encontrarse en las nLD, no serían proteínas mayoritarias de la monocapa.

En este sentido, está descrito que las bacterias que poseen cLD no poseen proteínas de la familia PAT en su monocapa, sino que poseen proteínas similares a las apoproteínas presentes en las lipoproteínas de mamíferos [121]. Hasta la fecha, en las nLD no hemos identificado proteínas de la familia PAT por estudios de proteómica, ni por estudios de western blot [18], y por lo tanto estos datos podrían implicar que las proteínas de las nLD sean muy diferentes a las de las cLD, ya que las cLD poseen como proteína mayoritaria a la perilipina.

Estos datos podrían explicarse si consideramos un origen endosimbiótico del núcleo celular. Por lo tanto, las nLD podrían tener similitudes con las cLD de bacterias, y no con las cLD de la propia célula dónde se encuentran. De confirmarse esta hipótesis, sería más probable que las nLD se originen en el propio núcleo con

una composición proteica y lipídica característica, ya que es difícil considerar que la génesis de las nLD sea común al de las cLD en el RE, y luego las nLD perdieran las proteínas de la familia PAT en su tránsito al núcleo, a través del poro nuclear. Otra posibilidad es que exista un mecanismo intermedio, en el que las nLD se originen en el RE, no incorporen las PAT y luego entren al núcleo por el complejo del poro y ahí adquieran sus propios componentes. Avalando esta última hipótesis, la presencia de la importina, determinada por estudios de proteómica en las nLD sin purificar, explicaría el paso por el complejo del poro de una nLD inmadura muy pequeña, cuyo tamaño sería menor al límite de resolución del microscopio, y que por modelos matemáticos tendría unos 15 nm [52] de diámetro.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

## 7.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

### 7.1.1. Animales

Los animales fueron provistos por el Bioterio General de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata. Los protocolos en los que se utilizaron animales (vertebrados) en investigaciones biomédicas fueron supervisados por el Comité Interno de Bienestar Animal integrado por personal del INIBIOLP y del CIC (Centro de Investigaciones Cardiovasculares) y cumplieron con las normas de ética vigentes.

Se utilizaron ratas macho endocriadas jóvenes de la cepa Wistar. Se optó por trabajar con ratas macho ya que estos animales no presentan las variaciones hormonales que se observa en las hembras y, por lo tanto, se evita la necesidad de sincronizar a los animales en una misma etapa.

Los animales estuvieron alojados en jaulas compartidas por 4-5 ratas, en un ambiente con la temperatura controlada en  $24 \pm 2$  °C y sujetos a períodos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad, siendo la medianoche el punto medio del período de oscuridad.

Las ratas se alimentaron con una dieta comercial para roedores (Alimento para Ratas y Ratones ACAI (San Nicolás, Argentina)). El alimento y el agua se les administraron *ad libitum*. La composición de la dieta fue la siguiente: 20% de proteínas y 4 % de lípidos totales, con una composición de ácidos grasos (peso %) de 15,6% de 16:0, 1,1% de 16:1, 6,3% de 18:0, 26,9% de 18:1n-9, 1,6% de 18:1n-7, 42,7% de 18:2n-6, 5,7% de 18:3n-3, y trazas de 14:0, 20:4n-6 y 22:6n-3.

Los experimentos se realizaron de acuerdo a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (1996), *National Academy Press*). La eutanasia de los animales se implementó mediante decapitación, procedimiento virtualmente indoloro por su rapidez, que permite obtener fluidos y tejidos anatómicamente intactos y no contaminados químicamente. Dicho procedimiento estuvo a cargo del personal del Bioterio, y se realizó a las 8 a.m. para evitar variaciones en los datos debidas a ritmos circadianos propios de los animales [186].

### 7.1.2. Cultivo celular

#### 7.1.2.1. Cultivo de células HepG2

Las células HepG2 constituyen una línea celular perpetua que deriva de un tejido extraído del hígado de un varón caucásico americano de 15 años diagnosticado con un carcinoma hepatocelular. Estas células son de morfología epitelial y poseen un número modal de 55 cromosomas. Conservan gran parte de las características bioquímicas de las células del parénquima hepático [187], [188] y, dado que presentan un alto grado de diferenciación morfológica y funcional, constituyen un buen modelo para el estudio del tráfico intracelular y de lípidos. Se caracterizan por mantener la mayoría de las actividades de metabolización de xenobióticos y se han reportado como un sistema útil y confiable para predecir tanto el metabolismo, como el efecto citoprotectivo o la citotoxicidad de diferentes químicos y fármacos en el hígado humano [189] así como también son ampliamente utilizadas como modelo de carcinoma hepatocelular [190], [191].

Células HepG2 (American Type Culture Collection (ATCC)) se crecieron y mantuvieron en medio mínimo Eagle (MEM) (Gibco, Invitrogen Corporation) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Córdoba, Argentina) al 10 % (v/v) y estreptomycin 0,1 mg/l. Las células se cultivaron a 37°C en estufa de cultivo gaseada con 5% (v/v) CO<sub>2</sub>/aire adheridas a botellas plásticas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>.

El medio fue reemplazado cada 3-4 días hasta que las células alcanzaron aproximadamente un 90% de confluencia, momento en que se procedió a subcultivarlas. Las células se separaron de la superficie incubándolas con tripsina-EDTA (0,25%, 1 mM EDTA) (Gibco, Invitrogen Corporation) durante 5-10 minutos en estufa a 37°C. La actividad de la tripsina se detuvo por adición de medio suplementado con 10% SFB y a partir de la suspensión celular resultante se realizó la siembra. Las células se plaquearon, dependiendo de los requerimientos experimentales, en placas de Petri de 100 mm de diámetro (ensayos de composición lipídica y fraccionamiento celular), en placas de 96 pocillos (ensayos de MTT) o en placas de 6 pocillos (ensayos de recuento celular) sobre cubreobjetos (ensayos de microscopía).



### 7.1.2.2. Cultivo primario de hepatocitos

#### 7.1.2.2.1. Aislamiento de hepatocitos de rata

Se utilizaron ratas Wistar jóvenes de 70-80 días con un peso de 200-250 g. El aislamiento de células hepáticas se realizó mediante un método enzimático de dos etapas descrito por Seglen [112], con algunas modificaciones. Las ratas se anestesiaron vía subcutánea con Ketamina 50 Holliday (75 mg/kg peso) y Diazepam 5 mg/ml Lamar (5 mg/kg peso). Se abrió quirúrgicamente el abdomen del animal y se perfundió el hígado con una solución carente de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  suplementada con EGTA, Buffer 1 (Solución de Hanks' (KCl 0,4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06 g/L, NaCl 8,0 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,06 g/L, D-Glucosa 1,0 g/L, HEPES 6,5 g/L) suplementada con penicilina 10.000 unidades/ml, estreptomicina 10.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y EGTA 0,19 mg/ml), seguida de la perfusión con una solución de Colagenasa tipo IV, Buffer 2 (Solución de Hanks' suplementada con penicilina 10.000 unidades/ml, estreptomicina 10.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $\text{CaCl}_2$  0,074 g/L y Colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 0,025%), ambas soluciones termostatizadas a 37°C. Se extrajo el hígado y se disgregó manualmente sobre caja de Petri bajo flujo laminar, agregando solución de Hanks'. La suspensión de células resultante se filtró en una malla estéril y se centrifugó a 500×g por 3 minutos. Del pellet se tomó un pequeño volumen y se determinó la viabilidad celular por la técnica de exclusión con Azul Tripán.

#### **Sistema de perfusión de hígado de rata (Técnica de Seglen modificada):**

Se utilizó un sistema que consta de una bomba conectada a una llave de 3 pasos, y una serie de mangueras que permiten conectar los buffers empleados (Buffer1 y Buffer2) a diferentes cánulas, las cuales se utilizaron para conectar el sistema de bombeo con la circulación del animal.

Pasos realizados:

- 1) Se trabajó en las máximas condiciones posibles de esterilidad. Se colocaron dos mecheros para mantener la esterilidad del ambiente y todos los utensilios utilizados y soluciones se esterilizaron apropiadamente. Por su parte, ambos buffers se termostataron a 37°C.
- 2) La rata se anestesió vía subcutánea.
- 3) Posteriormente, el animal se fijó a un soporte mediante cinta adhesiva.

- 4) Se rasuró el abdomen del mismo.
- 5) Se cortó la primera capa de piel y luego se cortó el peritoneo, con un primer cote longitudinal y 2 hacia los costados, de forma de exponer los órganos del animal.
- 6) Se localizaron las venas porta (VP), vena cava inferior (VCI) y superior (VCS).
- 7) Se colocaron dos hilos por debajo de la VCI, dos por debajo de la VP y dos por debajo de la VCS.
- 8) El sistema de bombeo se purgó con el Buffer1.
- 9) Inicialmente se canuló la VP y se cortó la VCI. Rápidamente se prendió el sistema de bombeo, de manera de que el Buffer1 ingresara al hígado por la VP y drenara hacia la VCI. El hígado se perfundió aproximadamente por unos 12 minutos a una velocidad de bombeo de 40 ml/min.
- 10) Posteriormente se canuló la VCS y el sistema se conectó al Buffer2. Se liberó el ingreso del Buffer1 por la VP y se ajustó la sutura de la VCI con hilos, de manera que el hígado se perfundió mediante el ingreso del Buffer2 por la VCS y salida por la VP. El sistema se dejó funcionando aproximadamente por unos 7-8 minutos.
- 11) Finalmente, el sistema se apagó, se desconectaron las mangueras, y se extrajo el hígado del animal.

#### 7.1.2.2.2. Condiciones del cultivo primario de hepatocitos

Los hepatocitos aislados se plaquearon dependiendo de los protocolos experimentales, en placas de 96 pocillos (ensayos de MTT) o sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos (microscopías) y se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco de alta concentración de glucosa (DMEM), conteniendo Glucosa 4,5 g/L, L-Glutamina 4 mM, clorhidrato de piridoxina 4 mg/L, piruvato de sodio 110 mg/L (Gibco, Invitrogen Corporation), suplementado con bicarbonato de sodio 3,7 g/L, SFB al 10 % (v/v), penicilina 100 U/ml y estreptomycin 0,1 g/L. El DMEM se reemplazó con medio fresco luego de las primeras 6 horas de cultivo, tiempo necesario para que las células se adhirieran a la placa de cultivo, con el fin de eliminar las células hematopoyéticas y los hepatocitos no adheridos. Luego el medio se cambió cada 24 h.

### 7.1.2.3. Tratamiento de los cultivos celulares

Se cultivaron células HepG2 y hepatocitos en MEM y DMEM suplementados con SFB al 10% respectivamente, como se describió anteriormente. Las células se trataron con ácido oleico (AO, sal sódica de ácido oleico ( $\geq 99\%$  pureza), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en concentración 100 o 400  $\mu\text{M}$ , o con AO 400  $\mu\text{M}$  y TC (Triacsin C, inhibidor de la biosíntesis de lípidos) en concentración 1, 2,5 o 5  $\mu\text{M}$  por 24 h. En algunos casos, células cultivadas con AO (400 $\mu\text{M}$ ) por 24 h se incubaron post tratamiento con medio fresco (sin AO) por 24, 48 ó 72 h. En todos los tratamientos, el medio se cambió por medio fresco cada 24 h. El AO se agregó complexado con sero-albúmina bovina (BSA) con una relación molar 6:1 de AO:BSA. En todos los experimentos se agregó un volumen total de medio de cultivo de 2 ml por pocillo.

### 7.1.2.4. Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por la técnica de recuento celular y por MTT [192].

#### 7.1.2.4.1. Recuento celular

Las células se tripsinizaron y la suspensión celular resultante se mezcló en proporción 1/1 (v/v) con una solución de Azul Tripán (azul diamina, azul niágara, azul vital) al 0,4% (p/v), un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir tejidos y células muertas. Transcurridos 2 minutos, la mezcla se colocó en la cámara de Neubauer, y se observó al microscopio óptico, donde se visualizaron las 4 zonas o esquinas denotadas en la grilla del portaobjetos. Se realizó el recuento de células totales observadas, se contaron tanto las que incorporaron el colorante (muertas) como las que no (vivas), procurando que el número de células por cuadrante no supere las 50 unidades.

#### **7.1.2.4.2. Ensayo de MTT**

El ensayo de MTT es un método ampliamente utilizado para evaluar la viabilidad celular. Es un método colorimétrico analítico-cuantitativo que se basa en la conversión del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), de color amarillento, en una sal insoluble de formazán, un compuesto azul-violáceo oscuro con un máximo de absorbancia cercano a 560 nm. La reacción se produce a partir de la actividad de enzimas mitocondriales, principalmente la succinato deshidrogenasa, capaces de reducir el MTT, el cual acepta los electrones de algún agente reductor o de coenzimas como NADH y NADPH produciendo cristales de formazán que posteriormente son solubilizados. La solución obtenida es cuantificada colorimétricamente [192]. Dado que esta reacción solo puede llevarse a cabo en células viables, la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células viables. Las células se incubaron con una solución de MTT (0,5 mg/ml en PBS) durante las últimas 2-3 horas de tratamiento. Las sales de formazán producidas se disolvieron en HCl 0,04 M en isopropanol y la absorbancia se determinó a 560 nm en lector de placas (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector).

### **7.2. FRACCIONAMIENTO CELULAR**

#### **7.2.1. Fraccionamiento a partir de células de hígado de rata**

##### **7.2.1.1. Aislamiento de núcleos de hígado de rata**

Se utilizaron ratas Wistar jóvenes de 60-70 días con un peso de 180-200 g. Se aislaron núcleos altamente purificados a partir de homogenato de hígado por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de acuerdo con el método de Blobel y Potter [193], modificado inicialmente por Kasper [194] y posteriormente en el laboratorio [18]: todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C y utilizando diferentes soluciones de sacarosa en Buffer A (Tris-HCl 0,05 M - pH: 7,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM y KCl 2,5 mM).

La eutanasia de los animales se realizó por decapitación, y en todos los casos a las 8 de la mañana para evitar variaciones debidas a ritmos circadianos [186]. Se extrajeron los hígados y se colocaron en sacarosa 0,25 M en Buffer A. El tejido se cortó con tijera y se lavó dos veces con dicha solución. Se agregó una cantidad de solución correspondiente al doble del peso del hígado en volumen y se homogeneizó en un homogenizador vidrio-teflón a 1.700 rpm. El homogenato obtenido se filtró a través de 4 capas de gasa. Se prepararon 6 tubos de polialómero de ultracentrífuga con 14 ml de sacarosa 2,3 M en Buffer A. Del filtrado colectado, se colocaron 8 ml en cada tubo, y se mezcló por inversión. Se agregó con jeringa un colchón de 3 ml de sacarosa 2,3 M en Buffer A en el fondo de cada tubo, y los mismos se centrifugaron en una ultracentrífuga Beckman Optima LE-80K con un rotor SW32Ti a  $106.750\times g$  a 4 °C durante 1 h. En la parte superior de cada tubo se obtuvo un disco rojo que se eliminó utilizando una espátula. El sobrenadante se descartó por inversión, y los tubos se colocaron invertidos en una gradilla. Las paredes del tubo se lavaron inicialmente con agua bidestilada con el fin de eliminar la solución de sacarosa remanente en las paredes del tubo, y posteriormente con Buffer A. El pellet nuclear obtenido se resuspendió en 3 ml de sacarosa 1 M en Buffer A y se transfirió a un homogenizador vidrio-vidrio de 15 ml. El homogenato nuclear se centrifugó en tubos Corex de 15 ml en una centrífuga Avanti JE a  $4.100\times g$  a 4 °C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en sacarosa 0,25 M en Buffer A y se centrifugó a  $900\times g$  a 4 °C durante 10 min.

Los núcleos obtenidos se resuspendieron en un homogenizador vidrio-vidrio de 1 ml con glicerol 25% en Buffer B (Tris-HCl 0,01 M - pH: 7,9). Se fraccionaron y se congelaron a -70 °C hasta su posterior utilización, con una concentración final de aproximadamente 30 mg prot./ml.

#### **7.2.1.2. Aislamiento de gotas lipídicas nucleares de hígado de rata**

En el laboratorio se elaboró una técnica para aislar gotas lipídicas nucleares [18] adaptando la técnica descrita por Ontko et al [115] para el aislamiento de las gotas lipídicas citosólicas. Con este propósito, se resuspendieron núcleos aislados a partir de un pool de 8 a 10 hígados en un volumen final de 2,5 ml en sacarosa 1 M en Buffer A. Se agregó PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) a una concentración

final de 1 mM, para inhibir la actividad de serin y cistein proteasas, los núcleos se mantuvieron en hielo y se sonicaron con un sonicador Branson 450 (Danbury, CT, USA) con el siguiente programa: Duty cycle 50%, setting 6.0, inicialmente 10 pulsos, 10 veces, seguido de 20 pulsos, 5 veces. Los núcleos sonicados se mezclaron con sacarosa 2,3 M en Buffer A, para dar una concentración final de 1,9 M en un volumen final de 7,5 ml.

Como control del método de aislamiento de las gotas lipídicas nucleares, se aislaron gotas lipídicas citosólicas bajo las mismas condiciones. En este caso, el homogenato de hígado obtenido en sacarosa 0,25 M en Buffer A como se describió previamente, se diluyó con sacarosa 2,3 M en Buffer A a un volumen final de 7,5 ml y una concentración final de sacarosa 1,9 M.

A continuación el lisado obtenido por sonicación nuclear y el homogenato hepático se sometieron a un gradiente de sacarosa como se detalla a continuación: se agregaron 1,5 ml de agua bidestilada a tubos de policarbonato del rotor SW 32 Ti, luego se incorporaron en forma sucesiva en el fondo del tubo 2,5 ml de sacarosa 0,3 M, 2,5 ml de sacarosa 0,7 M, 3 ml de sacarosa 1 M, 3 ml de sacarosa 1,3 M y 3 ml de sacarosa 1,5 M, todas en Buffer A. Por último se inyectaron en el fondo del tubo 7,5 ml del lisado nuclear, homogenato de hígado o sacarosa 1,9 M (blanco). Los tubos se ultracentrifugaron a  $25.770\times g$  a 4 °C durante 30 min. La banda superior de cada tubo se colectó con jeringa Hamilton y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

## **7.2.2. Fraccionamiento a partir de cultivo de células HepG2**

### **7.2.2.1. Aislamiento de gotas lipídicas de células HepG2**

Se cosecharon células HepG2 crecidas en placas de Petri y se trasvasaron a un tubo Falcon. Para ello, se eliminó el medio de las placas, se lavaron las células con buffer PBS (buffer fosfato salino) (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L  $KH_2PO_4$ , 3.14 g/L  $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ ) y se obtuvo una suspensión celular en PBS por raspado con espátula de silicona. Se separó una alícuota para determinación de proteínas, y el resto de la suspensión se centrifugó a  $500\times g$  durante 10 min.

El pellet celular se resuspendió en sacarosa 1 M en Buffer A. Se agregó un inhibidor de proteasas (Roche) y la muestra (mantenida en hielo) se sonicó utilizando un microtip escalonado doble (250  $\mu$ l-10 ml) con el siguiente programa: Potencia: 1, Duty Cycle: Constante, 4 pulsos de 10 s cada uno, Time: hold. La muestra se centrifugó a 500 $\times$ g a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se recolectó con jeringa Hamilton y se mezcló con sacarosa 2,3 M en Buffer A, para dar una concentración final de 1,9 M en un volumen final de 7,5 ml. A continuación el lisado celular se sometió a un gradiente de sacarosa tal como se detalla en la *Sección 1.2.1.2*. Se inyectaron en el fondo del tubo 7,5 ml del lisado celular o sacarosa 1,9 M (blanco). Los tubos se ultracentrifugaron a 25.770 $\times$ g a 4 °C durante 30 min. La banda superior se colectó con jeringa Hamilton y almacenó a -70 °C hasta su uso.

### 7.3. ANÁLISIS LIPÍDICO

#### 7.3.1. Extracción de lípidos totales

Los lípidos totales de las distintas fracciones obtenidas se extrajeron por el procedimiento de Folch y colaboradores [195]. En el caso de las células HepG2, el pellet celular obtenido (*Sección 7.2.2.1. Aislamiento de gotas lipídicas de células HepG2*) se resuspendió en 5 ml de cloroformo:metanol (2:1, v/v) y se agitó vigorosamente en vórtex. Por su parte, a las gotas lipídicas aisladas a partir de células HepG2 se les agregó la mezcla extractiva en una relación de una parte de muestra a 20 partes de la mezcla de Folch. Las muestras se colocaron ON a 4°C. Finalmente se adicionó un 20% de su volumen de agua bidestilada, se mezcló enérgicamente y se aguardó a la separación de las fases (una superior metanólico-acuosa y una inferior, clorofórmica). La fase superior se extrajo por succión y se descartó, y la fase inferior, con el extracto lipídico, se filtró utilizando papel Whatman en presencia de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro (retiene posibles contaminaciones de naturaleza acuosa), se evaporó mediante corriente de N<sub>2</sub> y los lípidos totales se resuspendieron en cloroformo.

### 7.3.2. Separación de clases lipídicas

Las diferentes clases de lípidos neutros se separaron por TLC en placas de sílica-gel G 60. Las placas se activaron previamente durante 1 hora a 120 °C. Se utilizó como fase móvil la siguiente mezcla de solventes: hexano : éter etílico : AcH (80:20:1, v/v/v) y el tiempo de desarrollo de la corrida cromatográfica fue de 60 min. La fracción correspondiente a lípidos polares permaneció en el punto de siembra, mientras que los lípidos neutros corrieron en mayor o menor medida con la fase móvil según su polaridad, a saber: MAG, 1,2 y 1,3-DAG, C, FA, TAG y CE ( $R_f$  de: 0,06; 0,13; 0,18; 0,27; 0,60 y 0,96). El revelado de las manchas se realizó con vapores de yodo en una cuba dispuesta a tal efecto, que contenía yodo bisublimado, en la cual se colocó la placa desarrollada y seca. El yodo es un reactivo que forma complejos inespecíficos con compuestos orgánicos de manera reversible, con lo cual las zonas en las que existían lípidos se tiñeron de color pardo, que se distinguió del fondo claro de la placa. Este procedimiento no permite la identificación exacta de los distintos lípidos pero sí permite comparar los  $R_f$  con los estándares que se siembran en forma simultánea en la misma placa.

### 7.3.3. Cuantificación de clases lipídicas

#### 7.3.3.1. Lípidos polares

Los lípidos polares se rasparon del punto de siembra de la TLC y se cuantificaron midiendo el contenido de fósforo en la muestra mediante el método de Chen y colaboradores [196]. La zona correspondiente a los lípidos polares se raspó y recogió en tubos de mineralización. Las muestras se mineralizaron con  $\text{HClO}_4$  70% a 120 °C ON, lo que produjo la liberación del fósforo inorgánico ( $\text{Pi}$ ). Luego de la mineralización, se adicionaron soluciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  (0,44% p/v) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 2,8% (v/v) y ácido ascórbico al 10% (p/v) en partes iguales y se incubaron a 45°C durante 20 minutos. Esta reacción genera la formación de un complejo entre el  $\text{Pi}$  y el  $\text{MoO}_4$  color verde-azulado. El color resultante se leyó contra un blanco de sílica gel preparado en las mismas condiciones que las muestras, a una longitud de onda



de 820 nm. La calibración del método colorimétrico se realizó utilizando una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM como estándar.

### 7.3.3.2. Lípidos neutros

El colesterol libre y los ésteres de colesterol se cuantificaron aplicando un spray de  $\text{FeCl}_3$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sobre las placas de TLC desarrolladas y carbonizando en estufa a  $100^\circ\text{C}$  durante 5-10 min. La aparición de coloración rojo-violácea indica la presencia de C y CE. Las manchas se cuantificaron con un software de análisis de imágenes digitales (ImageJ). La cantidad de C y CE se calculó utilizando curvas de calibración construidas a partir de mezclas de estándares de C (4-10  $\mu\text{g}$ ) y CE (colesteril-palmitato, 2-6  $\mu\text{g}$ ) resueltas en la misma TLC.

Los TAG se rasparon de las placas de TLC, se extrajeron con cloroformo y se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos para precipitar la sílica. La fracción clorofórmica se trasvasó a tubos de vidrio con tapa esmerilada y se evaporó el solvente a seco bajo corriente de  $\text{N}_2$ . Los TAG se cuantificaron a 505 nm utilizando el Kit comercial enzimático TG-Color (Wiener Lab, Rosario, Argentina), basado en la cuantificación del glicerol liberado por acción de una triacilglicérido lipasa. La cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración realizada con estándares de trimiristina (10-100  $\mu\text{g}$ ) sembrada y resuelta en la misma TLC que las muestras problema.

## 7.4. ANÁLISIS PROTEICO

### 7.4.1. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

El contenido de proteínas de las distintas fracciones celulares se cuantificó utilizando el método de Lowry y colaboradores [197].

Se tomaron alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de muestra, se agregaron 650  $\mu\text{l}$  de una solución formada por  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 % en  $\text{NaOH}$  0,1 M, tartrato de Na y K 2 % en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CuSO}_4$  1 % en  $\text{H}_2\text{O}$  (100:1:1, v/v/v). Este primer paso implica la formación de un complejo cobre-proteína en una disolución alcalina. Transcurridos 15 min, se

agregaron 50  $\mu$ l de reactivo de Folin. El complejo cobre-proteína redujo este reactivo fosfomolibdicofosfowolfrámico desarrollando un color azul intenso. Después de 30 min la reacción colorimétrica se cuantificó en un espectrofotómetro GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 (Sydney, Australia), a una longitud de onda de 750 nm. La calibración del método colorimétrico se realizó utilizando BSA cristalizada como estándar.

#### **7.4.2. SDS-PAGE de fracciones celulares**

A muestras de homogenato de hígado de rata y núcleos aislados con una concentración de 2 mg/ml se les agregó Buffer C (Tris 125 mM – pH: 6,8, glicerol 20% p/v, SDS 4% p/v, azul de bromofenol,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% p/v), y se desnaturalizaron incubándolas a 100 °C durante 6 minutos. Las muestras (50 y 100  $\mu$ g de proteínas por pocillo) se resolvieron electroforéticamente por SDS-PAGE mediante geles de 0,75 mm de espesor al 10% y con una corriente de 120 V, usando Buffer D de corrida (Tris base 25 mM – pH: 8,3, Glicina 192 mM y Dodecil sulfato de Sodio 3,5 mM).

Por su parte, a muestras del extracto proteico obtenido a partir de banda  $\alpha$  (Sección 7.4.6.1. *Protocolo de obtención del extracto proteico*) se les agregó Buffer E conteniendo Tris-HCl 0,35 M – pH: 6,8, glicerol 30% p/v, SDS 10% p/v, azul de bromofenol 0,012% y DTT 0,6 M, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las muestras se resolvieron electroforéticamente mediante geles comerciales de 1 mm de espesor al 10% (Bio-Rad, USA), usando Buffer D de corrida. Inicialmente se aplicó una corriente de 100 V durante 20 minutos, y posteriormente 200 V.

#### **7.4.3. Revelado de los geles**

##### **7.4.3.1. Tinción con Coomassie coloidal (G-250)**

Geles de poliacrilamida se sumergieron en una solución de Coomassie coloidal (G-250) (Coomassie G-250 0,12 %p/v, Sulfato de amonio 10 % p/v, Ácido

fosfórico 10 % p/v, Metanol 20 % v/v) y se dejaron inmersos ON. Para su decoloración se utilizó H<sub>2</sub>O milliQ.

#### 7.4.3.2. Tinción con Plata

Todas las soluciones se prepararon en H<sub>2</sub>O milliQ. Los geles de poliacrilamida se sumergieron en una solución de fijación (etanol 40%, ácido acético glacial 10%) y se mantuvieron en agitación durante 30 min. Posteriormente se los mantuvo en una solución de sensibilización (etanol 30%, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,2% (p/v), CH<sub>3</sub>COONa 6,8% (p/v)) nuevamente durante 30 min. Se realizaron 3 lavados con H<sub>2</sub>O milliQ, 5 min cada vez. Se agregó una solución de reacción con plata (AgNO<sub>3</sub> 0,25% (p/v)). Luego de 20 min, se realizaron 3 lavados con H<sub>2</sub>O milliQ, 30 segundos cada vez. Se agregó una solución de revelado (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,6% (p/v), Formaldehído 0,015% (p/v)) durante 2-5 min. La reacción de formación de Ag se detuvo con el agregado de una solución de parada (EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,5% (p/v)) durante 10 min. Por último se realizaron 3 lavados con H<sub>2</sub>O milliQ, 5 min cada vez.

#### 7.4.4. Western blot

Geles obtenidos de muestras de homogenato de hígado de rata y núcleo aislado luego de la electroforesis se transfirieron a membranas PVDF (BioRad) durante 1 hora a 100 V, usando Buffer F de transferencia (Tris base 25 mM – pH: 8,3, Glicina 192 mM y metanol 20% v/v). Los sitios de unión no específicos en la membrana de PVDF se bloquearon por incubación overnight con leche descremada al 5% p/v más Tween-20 0,1% v/v en Buffer G (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, NaCl 150 mM, - pH: 7,4).

Posteriormente, las tiras de membrana PVDF se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti Ces1d (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) con una dilución 1:1.000, y con el anticuerpo policlonal de conejo anti  $\beta$ -Tubulina (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) en concentración 1:200, en leche descremada al 1% p/v más Tween-20 0,1% v/v en Buffer G durante una hora a temperatura ambiente y con agitación suave.

Las membranas se lavaron 6 veces durante 5 min con Buffer G más Tween-20 0,1% v/v. Finalmente los inmunoblots se revelaron usando el anticuerpo secundario de cabra conjugado con peroxidasa (HRP) anti IgG de ratón (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) y el anticuerpo secundario de cabra conjugado con peroxidasa (HRP) anti IgG de conejo (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), ambos con una dilución 1:5.000 en leche descremada al 1% más Tween-20 0,1% v/v en Buffer G durante una hora a temperatura ambiente y con agitación suave.

Las membranas se lavaron 6 veces 5 min cada vez usando Tween-20 0,1% v/v en Buffer G. La actividad peroxidasa se reveló usando el sustrato Pierce ECL para Western Blot (Pierce, Rockford, IL) y se analizó con ImageQuant 350 (GE Health Care).

#### **7.4.5. 2-D Electroforesis**

Proteínas de muestras de homogenato de hígado de rata y núcleos aislados con una concentración de 2 mg/ml se separaron por la técnica de electroforesis en dos dimensiones.

##### **7.4.5.1. Primera dimensión**

Se utilizaron tiras con un rango de pH de 3-10. Las tiras se rehidrataron ON con Buffer H de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 2,5% (p/v), ASB-14 2% (p/v), Tris-HCl 30 mM pH=8,3, Buffer IPG 0,5% (v/v), De Streak Reagent 1,4%, Azul de Bromofenol100X (una punta de espátula)) en el equipo apropiado (Ettan IPGphor 3, GE Healthcare), y sobre las mismas se colocó un líquido de cobertura (Cover Fluid, GE Healthcare).

Se preparó la unidad (Manifold, GE Healthcare) para llevar a cabo la primera dimensión (separación de proteínas por diferencia de pH), todas las calles se cubrieron con el líquido de cobertura y sobre las mismas se colocaron las tiras hidratadas. La siembra se realizó por copa, las mismas se colocaron en un extremo de las tiras, se les agregó líquido de cobertura, y luego se sembró la muestra (100

µg de proteínas), a la que previamente se le agregó Buffer IPG 0,5% (v/v), DTT 10 mM y Azul de Bromofenol. Se colocaron los electrodos y se realizó la corrida electroforética utilizando el Software IPGphor3 (GE Healthcare).

#### 7.4.5.2. Segunda dimensión

Las tiras se colocaron en un Buffer I de equilibrio (Urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM, Glicerol 30% (p/v)) al que se le agregó DTT 10 mg/ml, y se mantuvieron en agitación durante 15 min. Luego se colocaron en Buffer I de equilibrio con Iodoacetamida 25 mg/ml y se dejaron otros 15 minutos con agitación (en oscuridad). Se prepararon los geles para la segunda dimensión (separación de proteínas por diferencia de peso) y se colocó cada tira en la calle de siembra del mismo, las cuáles se cubrieron con una solución de agarosa (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% SDS, 0,5% agarosa, 0,002% azul de bromofenol). El patrón de peso molecular (PM) se sembró en un extremo. Se agregó el Buffer D de corrida y se realizó la corrida a 40 mA.

#### 7.4.6. Proteómica de las gotas lipídicas nucleares

##### 7.4.6.1. Protocolo de obtención del extracto proteico

El extracto proteico se obtuvo a partir de la banda superior (banda  $\alpha$ ) cuando la muestra sonicada de núcleos de hígado de rata se centrifugó en un gradiente de densidad (*Sección 7.2.1.2. Aislamiento de gotas lipídicas nucleares de hígado de rata*). Todos los pasos se realizaron a 4 °C.

La banda  $\alpha$  se concentró 60 veces mediante un filtro con un tamaño de poro equivalente a 3 kDa (Millipore Amicon Ultra 0.5 ml 3K), o bien, mediante un filtro con un tamaño de poro equivalente a 100 kDa (Millipore Amicon Ultra 15 ml 100K). La muestra se lavó con Tris-HCl 50 mM, y luego, en algunos casos, con NaCl 0,5 M Tris-HCl 50 mM (el tratamiento con sales debilita las uniones débiles entre proteínas). Se agregó un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) y un Buffer J de lisis conteniendo Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, ASB-14 2% y Tris-HCl 30 mM

pH=8,3. La muestra se dejó ON a 4 °C. Luego, la muestra se mantuvo en hielo y se sonicó con una punta de 1/8" OD con el siguiente programa: 20% de amplitud con ciclos de 0,5/0,5 segundos (encendido/apagado) por 60 segundos, y luego, 35% de amplitud con ciclos de 0,5/0,5 segundos (encendido/apagado) por 30 segundos. La muestra sonicada se concentró usando un filtro con un tamaño de poro equivalente a 10 kDa (Millipore Amicon Ultra 0,5 ml 10K).

Las proteínas se precipitaron con el kit comercial 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. NJ 08855-1327, USA) y el precipitado se resuspendió en un Buffer K de lisis conteniendo Urea 8 M, CHAPS 2.5%, ASB-14 2% y Tris-HCl 30 mM.

#### 7.4.6.2. GeLC-MS

Las proteínas resueltas por SDS-PAGE a partir del extracto proteico de gotas lipídicas nucleares fueron sometidas a digestión trípica *in-gel*. Cada una de las calles del gel se cortó en trozos, de manera de poder hacer un análisis de la totalidad de las proteínas presentes en cada calle sembrada. De esta manera, los trozos de gel generados se trataron con  $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$  por 15 min, se sonicaron en baño y luego se les agregó la mezcla acetonitrilo (ACN): $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$  50 mM (1:1) durante otros 15 min y se volvió a sonicar en baño, de manera de extraer el colorante de tinción Coomassie G-250 del gel. Este procedimiento se realizó dos veces. Posteriormente se llevó a cabo un paso de reducción con DTT 10 mM en  $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$  50 mM durante 30 min a temperatura ambiente. Se continuó con un paso de alquilación con Iodoacetamida (IAA) 25 mM en  $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$  50 mM por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizó un lavado con ACN: $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$  50 mM (1:1) durante 15 minutos, y luego, se agregó ACN 100% de manera de deshidratar completamente los trozos de gel. Finalmente se realizó la digestión peptídica con tripsina 1 mg/ml (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega Corporation, WI 53711-5399, USA) durante 2-3 horas a 37 °C en cámara húmeda. Los péptidos de digestión resultantes se extrajeron con ACN: $\text{CF}_3\text{COOH}$  0,5% (1:1), se llevaron a seco mediante centrifugación al vacío, y se resuspendieron en solución de ácido fórmico al 0,1% v/v.

En una primera instancia se verificó la eficiencia de la digestión trípica de cada muestra mediante análisis por MALDI-TOF MS. Para esto, a 0,5 µl de la mezcla de digestión se le agregó 0,5 µl de HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano- 4-hidroxicinámico). La muestra se analizó una vez cristalizada con la matriz sobre la placa del MALDI.

Posteriormente se realizó el análisis por nLC-MS/MS (nano-cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas de trampa iónica). La mezcla peptídica se separó mediante C18 HPLC fase reversa (300nl/min), en nano-columnas (10 cmx75 µm) por un gradiente linear de ACN (5-40%) y el efluente de las columnas se analizó directamente en un Espectrómetro de Masas de Trampa Iónica (Amazon-ETD, Bruker) (nESI +Trampa Iónica). Los péptidos se analizaron por *full-scan mass measurements* y los cuatro péptidos más abundantes se fragmentaron por Disociación Inducida por Colisión (CID). La identificación de proteínas a partir de los datos resultantes de la MS se realizó mediante el algoritmo de búsqueda MASCOT utilizando los siguientes parámetros: Base de datos: SwissProt; Enzima: tripsina; Modificaciones variables: Carbamilometilación (C) – Oxidación (M); Cortes perdidos: 2; Taxonomía: rata; Tolerancia de fragmentación: 0,6 Da; Valor de punto de corte: péptidos > 15; al menos uno de los péptidos > 35; proteína > 30.

#### 7.4.6.3. Análisis *in silico*

El modelo predicho de la estructura terciaria de Ces1d de rata se realizó mediante el servidor online Phyre2 (*Protein Homology/Analogy Recognition Engine*) V 2.0 [198]. Phyre2 utiliza diferentes bases de datos, tales como *Structural Classification of Proteins* (SCOP) y *Protein Data Bank* (PDB). A través de diferentes pasos secuenciales, como la construcción de perfiles, análisis de similitud, y análisis de propiedades estructurales, Phyre2 selecciona el molde (*template*) más adecuado y, en base a este, genera un modelo proteico.

Las secuencias de Ces1d de rata (ID: P16303) y CES1 de humano (ID: P23141) se extrajeron de la base de datos de UniProt y se alinearon utilizando el algoritmo ClustalW2 [199], con los siguientes parámetros: *Gapopen* 10.0; *gapextend* 0.5; *endopen* 10.0; *endextend* 0.5; *Matrix*: EBLOSUM62; *Gap penalty*: 10.0; *Extend penalty*: 0.5.

## 7.5. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA

### 7.5.1. Microscopía de campo claro

Células HepG2 y hepatocitos crecidos sobre cubreobjetos se fijaron incubándolos en frío ON con paraformaldehído al 4% en buffer PBS. Los preparados se observaron en un microscopio de campo claro Olympus BX51 (Shinjuku, Tokyo, Japan) y se capturaron imágenes con el software de adquisición Image-Pro plus versión 5.1.

### 7.5.2. Microscopía de epifluorescencia

Células HepG2 y hepatocitos crecidos sobre cubreobjetos se fijaron incubándolos en frío ON con paraformaldehído al 4% en buffer PBS. Posteriormente, se lavaron 3 veces con el buffer durante 10, 10 y 5 min por lavado. Las células se permeabilizaron incubándolas por 30 min con Tritón X-100 al 0,008% (v/v) preparado en PBS, y seguidamente se lavaron 4 veces con buffer durante 10, 10, 10 y 5 min por lavado. Finalmente, las células se incubaron 24 h con el marcador de ADN, DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), con una concentración final de 1 µg/ml, y con el marcador de lípidos neutros, BODIPY493/503 (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), con una concentración final de 1 µg/ml, ambos disueltos en BSA 3% en PBS. Luego de tres lavados (10 min cada vez) con el respectivo buffer, las muestras se montaron sobre portaobjetos, y los preparados se observaron con el microscopio de epifluorescencia Olympus BX51. Se capturaron imágenes con el software de adquisición Image-Pro plus versión 5.1.

### 7.5.3. Microscopía de fluorescencia confocal

Células HepG2 crecidas sobre cubreobjetos se fijaron y permeabilizaron como se indicó previamente (*Sección 7.5.2. Microscopía de epifluorescencia*). Posteriormente, se procedió a incubarlas durante 48 h con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ces1d con una dilución 1:250 en BSA 3% en PBS. Luego de 3 lavados con PBS (10 min cada vez) se procedió a incubar las células por 24 h con: el



anticuerpo secundario de gallina conjugado con sonda fluorescente anti IgG de ratón (594 nm-617 nm) (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) con una dilución 1:250, el marcador de ADN, DAPI, con una concentración final de 1 µg/ml y el marcador de lípidos neutros BODIPY493/503, con una concentración final de 1 µg/ml, todos disueltos en BSA 3% en PBS. Seguidamente las muestras se lavaron 3 veces con buffer y se montaron sobre portaobjetos para su observación. Se utilizó un microscopio confocal de epifluorescencia Olympus Fluoview FV1000 (modelo BX61), equipado con lasers de 405, 473 y 559 nm. Las imágenes presentadas se tomaron usando un objetivo UPLSAPO 40X (apertura numérica de 0,95) y un zoom digital de 2-3.

## **7.6. ANÁLISIS DE IMÁGENES**

### **7.6.1. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia**

Para cuantificar la abundancia (número) de nLD y cLD por célula, y estimar sus tamaños, imágenes de microscopía de epifluorescencia (núcleos marcados con DAPI, y nLD y cLD con BODIPY493/503) de células HepG2 y hepatocitos se capturaron con el software de adquisición Image-Pro plus versión 5.1 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA) y se analizaron en conjunto con el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Las áreas de las nLD y cLD se dibujaron manualmente. De esta manera, se determinó el diámetro de cada LD y el número total de LD en el núcleo (nLD) y el citosol (cLD) en cada célula. A partir del análisis de un gran número de imágenes, se calculó la mediana del diámetro tanto para las nLD, como para las cLD, y el volumen total de nLD y cLD por célula (multiplicando la mediana del diámetro por el número (media) de nLD y cLD, respectivamente, presentes por célula) para cada una de las condiciones experimentales estudiadas. Del análisis de los datos (diámetros), se determinaron los tres cuartiles, el diámetro máximo y mínimo, y la distribución de tamaños.

### 7.6.2. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia confocal

Para obtener imágenes a partir de los preparados de fluorescencia confocal e inmunofluorescencia se utilizó el software FluoView versión 1.7.3.0. Se observaron al menos 10 campos representativos y se tomaron imágenes con espesores de sección entre 0,20 y 0,68  $\mu\text{m}$ . Las imágenes se guardaron en formato .oib (*Original Imaging Format*: formato de archivos de Olympus) para su posterior análisis.

Las imágenes obtenidas se procesaron y, se realizaron reconstrucciones en el eje Z y tridimensionales (3D). Con este propósito el *stack* (“pila”) de imágenes fue procesado con el uso de dos programas. Con el programa ImageJ las imágenes se deconvolucionaron, pseudocolorearon, y de la integración de los diferentes planos focales se obtuvieron las vistas ortogonales en los planos XZ e YZ; y con el programa Resolve RT version 4.0 se confeccionaron las reconstrucciones 3D.

Para realizar las reconstrucciones 3D se utilizó la representación mediante “isosuperficies” generadas tomando como base la fluorescencia de las distintas sondas usadas. Las mejores reconstrucciones se obtuvieron utilizando superficies lisas tanto en el caso de las gotas lipídicas, y como para la representación del espacio ocupado por los núcleos (fluorescencia del DAPI).

Para la cuantificación de los índices de colocación (coeficiente de correlación de Pearson, y coeficientes de Mander M1 y M2) se utilizó el programa ImageJ-win64. La cuantificación de los índices se efectuó sobre al menos tres imágenes representativas de cada tratamiento realizado.

## 7.7. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para comparar las composiciones lipídicas de las diferentes fracciones celulares los datos se normalizaron expresando los resultados en relación al número de células de las que provenía cada muestra en particular. Por lo tanto, dependiendo del tipo de normalización, los datos se expresaron como  $\mu\text{g}/10^6$  células o como  $\text{nmol}/10^6$  células.

Debido a la baja recuperación, los núcleos y las nLD se aislaron a partir de pooles de hígados de 10 a 12 animales. Por su parte, los homogenatos de células

HepG2 se obtuvieron a partir de células provenientes de la siembra en 3 cajas de Petri, y las LD a partir de pooles de homogenatos de células sembradas en 6 placas de Petri.

Los resultados experimentales se expresaron como el promedio de al menos 3 determinaciones  $\pm$  la desviación estándar (DS). El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test Posthoc de comparación de medias (Test HSD de Tukey).

Los análisis de los parámetros morfológicos y de cuantificación de las nLD y cLD a partir de las imágenes de microscopía de epifluorescencia (*Sección 7.6.1. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia*) se realizaron mediante el estudio de imágenes en las que se contaron al menos 10 campos. El volumen total de nLD y cLD por célula se calculó considerando que estas estructuras poseen una forma de esferas ideales, para los que se tuvieron en cuenta las medianas de los datos y el número de LD en el núcleo (nLD) y en el citosol (cLD).

Para evaluar la normalidad de los datos se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de aquellos datos que no siguieron una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de un test Posthoc para analizar las diferencias entre medianas (test de Nemenyi).

En el caso de la comparación de proporciones que se realizó en el análisis de la distribución de diámetros, se utilizó el test de proporciones con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

En todos los análisis estadísticos que se realizaron, aquellas diferencias de medianas en las cuales el valor de  $p$  quedó por debajo de 0,001 se consideraron altamente significativas (\*\*); para valores entre 0,01 y 0,001 significativas (\*); entre 0,05 y 0,01 poco significativas (\*) y para valores de  $p > 0.05$  no significativas.

Los cálculos estadísticos se realizaron con el SPSS 15.0 para Windows (IBM Corp. (2006), Somers, NY, USA).

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] “Atlas de Histología Vegetal y Animal.” [Online]. Available: <http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-higado.php>.
- [2] “Atlas de citología y anatomía microscópica de Kuehnel, W., Asensio, Jordi tr.: Ediciones Omega, S.A., Barcelona. - 1982.”.
- [3] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, “Molecular Biology of the Cell.” Garland Science, 2002.
- [4] M. W. Hetzer, “The nuclear envelope.,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 3, p. a000539, Mar. 2010.
- [5] S. R. Solmaz, R. Chauhan, G. Blobel, and I. Melčák, “Molecular architecture of the transport channel of the nuclear pore complex.,” *Cell*, vol. 147, no. 3, pp. 590–602, Oct. 2011.
- [6] S. Bilokapic and T. U. Schwartz, “3D ultrastructure of the nuclear pore complex.,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 24, no. 1, pp. 86–91, Feb. 2012.
- [7] A. Malhas, C. Goulbourne, and D. J. Vaux, “The nucleoplasmic reticulum: form and function.,” *Trends Cell Biol.*, vol. 21, no. 6, pp. 362–73, Jun. 2011.
- [8] M. Fricker, M. Hollinshead, N. White, and D. Vaux, “Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope.,” *J. Cell Biol.*, vol. 136, no. 3, pp. 531–44, Feb. 1997.
- [9] N. Johnson, M. Krebs, R. Boudreau, G. Giorgi, M. LeGros, and C. Larabell, “Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation.,” *Differentiation.*, vol. 71, no. 7, pp. 414–24, Sep. 2003.
- [10] D. A. Collings, C. N. Carter, J. C. Rink, A. C. Scott, S. E. Wyatt, and N. S. Allen, “Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations.,” *Plant Cell*, vol. 12, no. 12, pp. 2425–2440, Dec. 2000.
- [11] S. Karasaki, “An electron microscope study of intranuclear canaliculi in Novikoff hepatoma cells.,” *Cancer Res.*, vol. 30, no. 6, pp. 1736–42, Jun. 1970.
- [12] S. L. Gupton, D. A. Collings, and N. S. Allen, “Endoplasmic reticulum targeted GFP reveals ER organization in tobacco NT-1 cells during cell division.,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 44, no. 2–3, pp. 95–105, Jan. .
- [13] P. P. Lui, S. K. Kong, T. T. Kwok, and C. Y. Lee, “The nucleus of HeLa cell contains tubular structures for Ca<sup>2+</sup> signalling.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 247, no. 1, pp. 88–93, Jun. 1998.
- [14] M. D. Bootman, C. Fearnley, I. Smyrnias, F. MacDonald, and H. L. Roderick, “An update on nuclear calcium signalling.,” *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. Pt 14, pp. 2337–50, Jul. 2009.
- [15] N. O. Favale, M. C. Fernández-Tome, L. G. Pescio, and N. B. Sterin-Speziale, “The rate-limiting enzyme in phosphatidylcholine synthesis is associated with nuclear speckles under stress conditions.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1801, no. 11, pp. 1184–94, Nov. 2010.

- [16] M. Dundr and T. Misteli, "Biogenesis of nuclear bodies.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 12, p. a000711, Dec. 2010.
- [17] D. L. Spector, "SnapShot: Cellular bodies.," *Cell*, vol. 127, no. 5, p. 1071, Dec. 2006.
- [18] J. P. Layerenza, P. González, M. M. García de Bravo, M. P. Polo, M. S. Sisti, and A. Ves-Losada, "Nuclear lipid droplets: a novel nuclear domain.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1831, no. 2, pp. 327–40, Mar. 2013.
- [19] S. M. Maté, R. R. Brenner, and A. Ves-Losada, "Endonuclear lipids in liver cells.," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 84, no. 3–4, pp. 459–68, Jan. .
- [20] T. Y. Chang, C. C. Chang, X. Lu, and S. Lin, "Catalysis of ACAT may be completed within the plane of the membrane: a working hypothesis.," *J. Lipid Res.*, vol. 42, no. 12, pp. 1933–8, Dec. 2001.
- [21] N. Visa and P. Percipalle, "Nuclear functions of actin.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 4, p. a000620, Apr. 2010.
- [22] M. Fukasawa, "Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle.," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 33, no. 3, pp. 355–9, Jan. 2010.
- [23] K. Moriishi, I. Shoji, Y. Mori, R. Suzuki, T. Suzuki, C. Kataoka, and Y. Matsuura, "Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus.," *Hepatology*, vol. 52, no. 2, pp. 411–20, Aug. 2010.
- [24] M. M. Samsa, J. A. Mondotte, N. G. Iglesias, I. Assunção-Miranda, G. Barbosa-Lima, A. T. Da Poian, P. T. Bozza, and A. V Gamarnik, "Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation.," *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 10, p. e1000632, Oct. 2009.
- [25] I. C. Martins, F. Gomes-Neto, A. F. Faustino, F. A. Carvalho, F. A. Carneiro, P. T. Bozza, R. Mohana-Borges, M. A. R. B. Castanho, F. C. L. Almeida, N. C. Santos, and A. T. Da Poian, "The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif.," *Biochem. J.*, vol. 444, no. 3, pp. 405–15, Jun. 2012.
- [26] M. Stehr, A. A. Elamin, and M. Singh, "Cytosolic lipid inclusions formed during infection by viral and bacterial pathogens.," *Microbes Infect.*, vol. 14, no. 13, pp. 1227–37, Nov. 2012.
- [27] S. Karasaki, "Passage of cytoplasmic lipid into interphase nuclei in preneoplastic rat liver.," *J. Ultrastruct. Res.*, vol. 42, no. 5, pp. 463–78, Mar. 1973.
- [28] O. Kawanami, V. J. Ferrans, J. D. Fulmer, and R. G. Crystal, "Nuclear inclusions in alveolar epithelium of patients with fibrotic lung disorders.," *Am. J. Pathol.*, vol. 94, no. 2, pp. 301–22, Feb. 1979.
- [29] M. Bell, H. Wang, H. Chen, J. C. McLenithan, D.-W. Gong, R.-Z. Yang, D. Yu, S. K. Fried, M. J. Quon, C. Londos, and C. Sztalryd, "Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance.," *Diabetes*, vol. 57, no. 8, pp. 2037–45, Aug. 2008.

- [30] K. Rasineni and C. A. Casey, "Molecular mechanism of alcoholic fatty liver.," *Indian J. Pharmacol.*, vol. 44, no. 3, pp. 299–303, May 2012.
- [31] A. Viarengo, D. Lowe, C. Bolognesi, E. Fabbri, and A. Koehler, "The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms.," *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 146, no. 3, pp. 281–300, Sep. 2007.
- [32] D. M. Kashnig and C. B. Kasper, "Isolation, morphology, and composition of the nuclear membrane from rat liver.," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 14, pp. 3786–92, Jul. 1969.
- [33] H. Kleinig, "Nuclear membranes from mammalian liver. II. Lipid composition.," *J. Cell Biol.*, vol. 46, no. 2, pp. 396–402, Aug. 1970.
- [34] T. W. Keenan, R. Berezney, L. K. Funk, and F. L. Crane, "Lipid composition of nuclear membranes isolated from bovine liver.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 203, no. 3, pp. 547–54, Jun. 1970.
- [35] A. S. Khandwala and C. B. Kasper, "The fatty acid composition of individual phospholipids from rat liver nuclear membrane and nuclei.," *J. Biol. Chem.*, vol. 246, no. 20, pp. 6242–6, Oct. 1971.
- [36] E. Albi, M. Mersel, C. Leray, M. L. Tomassoni, and M. P. Viola-Magni, "Rat liver chromatin phospholipids.," *Lipids*, vol. 29, no. 10, pp. 715–9, Oct. 1994.
- [37] E. Albi, I. Peloso, and M. V Magni, "Nuclear membrane sphingomyelin-cholesterol changes in rat liver after hepatectomy.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 262, no. 3, pp. 692–5, Sep. 1999.
- [38] S. M. Maté, R. R. Brenner, and A. Ves-Losada, "Phosphatidyl choline fatty acid remodeling in the hepatic cell nuclei.," *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*, vol. 70, no. 1, pp. 49–57, Jan. 2004.
- [39] A. N. Hunt, G. T. Clark, G. S. Attard, and A. D. Postle, "Highly saturated endonuclear phosphatidylcholine is synthesized in situ and colocated with CDP-choline pathway enzymes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 11, pp. 8492–9, Mar. 2001.
- [40] I. A. Olave, S. L. Reck-Peterson, and G. R. Crabtree, "Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 71, pp. 755–81, Jan. 2002.
- [41] V. L. Gaveglio, S. J. Pasquaré, and N. M. Giusto, "Metabolic pathways for the degradation of phosphatidic acid in isolated nuclei from cerebellar cells.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 507, no. 2, pp. 271–80, Mar. 2011.
- [42] V. L. Gaveglio, S. J. Pasquaré, and N. M. Giusto, "Phosphatidic acid metabolism in rat liver cell nuclei.," *FEBS Lett.*, vol. 587, no. 7, pp. 950–956, Apr. 2013.
- [43] A. D. Petrescu, A. L. McIntosh, S. M. Storey, H. Huang, G. G. Martin, D. Landrock, A. B. Kier, and F. Schroeder, "High glucose potentiates L-FABP mediated fibrate induction of PPAR $\alpha$  in mouse hepatocytes.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1831, no. 8, pp. 1412–25, Aug. 2013.

- [44] P. Escher and W. Wahli, "Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions.," *Mutat. Res.*, vol. 448, no. 2, pp. 121–38, Mar. 2000.
- [45] Y. Guo, K. R. Cordes, R. V Farese, and T. C. Walther, "Lipid droplets at a glance.," *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. Pt 6, pp. 749–52, Mar. 2009.
- [46] A. Penno, G. Hackenbroich, and C. Thiele, "Phospholipids and lipid droplets.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1831, no. 3, pp. 589–94, Mar. 2013.
- [47] C. Chitraju, M. Trötz Müller, J. Hartler, H. Wolinski, G. G. Thallinger, A. Lass, R. Zechner, R. Zimmermann, H. C. Köfeler, and F. Spener, "Lipidomic analysis of lipid droplets from murine hepatocytes reveals distinct signatures for nutritional stress.," *J. Lipid Res.*, vol. 53, no. 10, pp. 2141–52, Oct. 2012.
- [48] M. Suzuki, Y. Shinohara, Y. Ohsaki, and T. Fujimoto, "Lipid droplets: size matters.," *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, vol. 60 Suppl 1, pp. S101–16, Jan. 2011.
- [49] R. Bartz, W.-H. Li, B. Venables, J. K. Zehmer, M. R. Roth, R. Welti, R. G. W. Anderson, P. Liu, and K. D. Chapman, "Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic.," *J. Lipid Res.*, vol. 48, no. 4, pp. 837–47, Apr. 2007.
- [50] T. C. Walther and R. V Farese, "The life of lipid droplets.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1791, no. 6, pp. 459–66, Jun. 2009.
- [51] L. Yang, Y. Ding, Y. Chen, S. Zhang, C. Huo, Y. Wang, J. Yu, P. Zhang, H. Na, H. Zhang, Y. Ma, and P. Liu, "The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans.," *J. Lipid Res.*, vol. 53, no. 7, pp. 1245–53, Jul. 2012.
- [52] R. A. Urrutia and F. Kalinec, "Biology and pathobiology of lipid droplets and their potential role in the protection of the organ of Corti.," *Hear. Res.*, May 2015.
- [53] L.-H. Huang, K. Nishi, S. Li, T. Ho, R. Dong, C. C. Y. Chang, and T.-Y. Chang, "Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 - significance of single-nucleotide polymorphism at residue 526 and the role of Pro347 near the fifth transmembrane domain.," *FEBS J.*, vol. 281, no. 7, pp. 1773–83, Apr. 2014.
- [54] H. Khandelia, L. Duelund, K. I. Pakkanen, and J. H. Ipsen, "Triglyceride blisters in lipid bilayers: implications for lipid droplet biogenesis and the mobile lipid signal in cancer cell membranes.," *PLoS One*, vol. 5, no. 9, p. e12811, Jan. 2010.
- [55] H. Robenek, M. J. Robenek, and D. Troyer, "PAT family proteins pervade lipid droplet cores.," *J. Lipid Res.*, vol. 46, no. 6, pp. 1331–8, Jun. 2005.
- [56] R. Ujwal and J. U. Bowie, "Crystallizing membrane proteins using lipidic bicelles.," *Methods*, vol. 55, no. 4, pp. 337–41, Dec. 2011.
- [57] K. M. Szymanski, D. Binns, R. Bartz, N. V Grishin, W.-P. Li, A. K. Agarwal, A. Garg, R. G. W. Anderson, and J. M. Goodman, "The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 52, pp. 20890–5, Dec. 2007.



- [58] W. Fei, H. Li, G. Shui, T. S. Kapterian, C. Bielby, X. Du, A. J. Brown, P. Li, M. R. Wenk, P. Liu, and H. Yang, "Molecular characterization of seipin and its mutants: implications for seipin in triacylglycerol synthesis.," *J. Lipid Res.*, vol. 52, no. 12, pp. 2136–47, Dec. 2011.
- [59] W. Fei, G. Shui, B. Gaeta, X. Du, L. Kuerschner, P. Li, A. J. Brown, M. R. Wenk, R. G. Parton, and H. Yang, "Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast.," *J. Cell Biol.*, vol. 180, no. 3, pp. 473–82, Feb. 2008.
- [60] N. Sahini and J. Borlak, "Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes," *Prog. Lipid Res.*, vol. 54, no. 1, pp. 86–112, 2014.
- [61] X. Cui, Y. Wang, Y. Tang, Y. Liu, L. Zhao, J. Deng, G. Xu, X. Peng, S. Ju, G. Liu, and H. Yang, "Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, no. 15, pp. 3022–30, Aug. 2011.
- [62] B. Kadereit, P. Kumar, W.-J. Wang, D. Miranda, E. L. Snapp, N. Severina, I. Torregroza, T. Evans, and D. L. Silver, "Evolutionarily conserved gene family important for fat storage.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 1, pp. 94–9, Jan. 2008.
- [63] B. N. Finck, M. C. Gropler, Z. Chen, T. C. Leone, M. A. Croce, T. E. Harris, J. C. Lawrence, and D. P. Kelly, "Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway.," *Cell Metab.*, vol. 4, no. 3, pp. 199–210, Sep. 2006.
- [64] W. Yang, S. Thein, X. Guo, F. Xu, B. Venkatesh, S. Sugii, G. K. Radda, and W. Han, "Seipin differentially regulates lipogenesis and adipogenesis through a conserved core sequence and an evolutionarily acquired C-terminus.," *Biochem. J.*, vol. 452, no. 1, pp. 37–44, May 2013.
- [65] D. A. Gross, C. Zhan, and D. L. Silver, "Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 49, pp. 19581–6, Dec. 2011.
- [66] D. A. Gross, E. L. Snapp, and D. L. Silver, "Structural insights into triglyceride storage mediated by fat storage-inducing transmembrane (FIT) protein 2.," *PLoS One*, vol. 5, no. 5, p. e10796, Jan. 2010.
- [67] D. J. Murphy, "The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals.," *Protoplasma*, vol. 249, no. 3, pp. 541–85, Jul. 2012.
- [68] D. T. Browman, M. B. Hoegg, and S. M. Robbins, "The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers.," *Trends Cell Biol.*, vol. 17, no. 8, pp. 394–402, Aug. 2007.
- [69] L. J. Pike, "The challenge of lipid rafts.," *J. Lipid Res.*, vol. 50 Suppl, pp. S323–8, Apr. 2009.
- [70] L. Rajendran, S. Le Lay, and H. Illges, "Raft association and lipid droplet targeting of flotillins are independent of caveolin.," *Biol. Chem.*, vol. 388, no. 3, pp. 307–14, Mar. 2007.

- [71] V. Haucke and G. Di Paolo, "Lipids and lipid modifications in the regulation of membrane traffic.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 19, no. 4, pp. 426–35, Aug. 2007.
- [72] A. Pol, S. Martin, M. A. Fernandez, C. Ferguson, A. Carozzi, R. Luetterforst, C. Enrich, and R. G. Parton, "Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 99–110, Jan. 2004.
- [73] M. A. McNiven and C. A. Casey, "Alcohol and lipid traffic don't mix.," *Hepatology*, vol. 53, no. 4, pp. 1073–5, Apr. 2011.
- [74] N. Xu, S. O. Zhang, R. A. Cole, S. A. McKinney, F. Guo, J. T. Haas, S. Bobba, R. V. Farese, and H. Y. Mak, "The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface.," *J. Cell Biol.*, vol. 198, no. 5, pp. 895–911, Sep. 2012.
- [75] H. R. Wurie, L. Buckett, and V. A. Zammit, "Evidence that diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) has dual membrane topology in the endoplasmic reticulum of HepG2 cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 42, pp. 36238–47, Oct. 2011.
- [76] D. F. Markgraf, R. W. Klemm, M. Junker, H. K. Hannibal-Bach, C. S. Ejsing, and T. A. Rapoport, "An ER protein functionally couples neutral lipid metabolism on lipid droplets to membrane lipid synthesis in the ER.," *Cell Rep.*, vol. 6, no. 1, pp. 44–55, Jan. 2014.
- [77] J. A. Olzmann, C. M. Richter, and R. R. Kopito, "Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 4, pp. 1345–50, Jan. 2013.
- [78] K. G. Soni, G. A. Mardones, R. Sougrat, E. Smirnova, C. L. Jackson, and J. S. Bonifacino, "Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets.," *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. Pt 11, pp. 1834–41, Jun. 2009.
- [79] D. L. Brasaemle and N. E. Wolins, "Packaging of Fat: An Evolving Model of Lipid Droplet Assembly and Expansion," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 4, pp. 2273–2279, Nov. 2011.
- [80] D. L. Brasaemle, V. Subramanian, A. Garcia, A. Marcinkiewicz, and A. Rothenberg, "Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 326, no. 1–2, pp. 15–21, Jun. 2009.
- [81] C. E. Smith and J. M. Ordovás, "Update on perilipin polymorphisms and obesity.," *Nutr. Rev.*, vol. 70, no. 10, pp. 611–21, Oct. 2012.
- [82] X. Li, J. Ye, L. Zhou, W. Gu, E. A. Fisher, and P. Li, "Opposing roles of cell death-inducing DFF45-like effector B and perilipin 2 in controlling hepatic VLDL lipidation.," *J. Lipid Res.*, vol. 53, no. 9, pp. 1877–89, Sep. 2012.
- [83] S. Ozeki, J. Cheng, K. Tauchi-Sato, N. Hatano, H. Taniguchi, and T. Fujimoto, "Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane.," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 12, pp. 2601–11, Jun. 2005.

- [84] M. R. Pulido, A. Diaz-Ruiz, Y. Jiménez-Gómez, S. Garcia-Navarro, F. Gracia-Navarro, F. Tinahones, J. López-Miranda, G. Frühbeck, R. Vázquez-Martínez, and M. M. Malagón, "Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity.," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, p. e22931, Jan. 2011.
- [85] V. Puri, "Fasting regulates FSP27 expression in the liver.," *J. Lipid Res.*, vol. 54, no. 3, pp. 569–70, Mar. 2013.
- [86] A. Vilà-Brau, A. L. De Sousa-Coelho, J. F. Gonçalves, D. Haro, and P. F. Marrero, "Fsp27/CIDEA is a CREB target gene induced during early fasting in liver and regulated by FA oxidation rate.," *J. Lipid Res.*, vol. 54, no. 3, pp. 592–601, Mar. 2013.
- [87] T. Gimm, M. Wiese, B. Teschemacher, A. Deggerich, J. Schödel, K. X. Knaup, T. Hackenbeck, C. Hellerbrand, K. Amann, M. S. Wiesener, S. Höning, K.-U. Eckardt, and C. Warnecke, "Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1.," *FASEB J.*, vol. 24, no. 11, pp. 4443–58, Nov. 2010.
- [88] C. D. Byrne, "Hypoxia and non-alcoholic fatty liver disease.," *Clin. Sci. (Lond.)*, vol. 118, no. 6, pp. 397–400, Mar. 2010.
- [89] D. Wiggins and G. F. Gibbons, "The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas.," *Biochem. J.*, vol. 284 ( Pt 2), pp. 457–62, Jun. 1992.
- [90] L. Y. Yang, A. Kuksis, J. J. Myher, and G. Steiner, "Origin of triacylglycerol moiety of plasma very low density lipoproteins in the rat: structural studies.," *J. Lipid Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 125–36, Jan. 1995.
- [91] D. L. Lankester, A. M. Brown, and V. A. Zammit, "Use of cytosolic triacylglycerol hydrolysis products and of exogenous fatty acid for the synthesis of triacylglycerol secreted by cultured rat hepatocytes.," *J. Lipid Res.*, vol. 39, no. 9, pp. 1889–95, Sep. 1998.
- [92] R. Lehner, J. Lian, and A. D. Quiroga, "Lumenal lipid metabolism: implications for lipoprotein assembly.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, no. 5, pp. 1087–93, May 2012.
- [93] N. E. Wolins, D. L. Brasaemle, and P. E. Bickel, "A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins.," *FEBS Lett.*, vol. 580, no. 23, pp. 5484–91, Oct. 2006.
- [94] J. Tsai, W. Qiu, R. Kohen-Avramoglu, and K. Adeli, "MEK-ERK inhibition corrects the defect in VLDL assembly in HepG2 cells: potential role of ERK in VLDL-ApoB100 particle assembly.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 211–8, Jan. 2007.
- [95] J. D. Sparks, C. E. Sparks, and K. Adeli, "Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, no. 9, pp. 2104–12, Sep. 2012.

- [96] H. Wang, E. Wei, A. D. Quiroga, X. Sun, N. Touret, and R. Lehner, "Altered lipid droplet dynamics in hepatocytes lacking triacylglycerol hydrolase expression.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 12, pp. 1991–2000, Jun. 2010.
- [97] A. D. Quiroga and R. Lehner, "Role of endoplasmic reticulum neutral lipid hydrolases.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 22, no. 6, pp. 218–25, Jun. 2011.
- [98] F. Wilfling, H. Wang, J. T. Haas, N. Krahmer, T. J. Gould, A. Uchida, J. X. Cheng, M. Graham, R. Christiano, F. Fröhlich, X. Liu, K. K. Buhman, R. a. Coleman, J. Bewersdorf, R. V. Farese, and T. C. Walther, "Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets," *Dev. Cell*, vol. 24, no. 4, pp. 384–399, 2013.
- [99] P. Boström, L. Andersson, M. Rutberg, J. Perman, U. Lidberg, B. R. Johansson, J. Fernandez-Rodriguez, J. Ericson, T. Nilsson, J. Borén, and S.-O. Olofsson, "SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 11, pp. 1286–93, Nov. 2007.
- [100] T. Ohya, M. Miaczynska, U. Coskun, B. Lommer, A. Runge, D. Drechsel, Y. Kalaidzidis, and M. Zerial, "Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes.," *Nature*, vol. 459, no. 7250, pp. 1091–7, Jun. 2009.
- [101] P. Boström, M. Rutberg, J. Ericsson, P. Holmdahl, L. Andersson, M. A. Frohman, J. Borén, and S.-O. Olofsson, "Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 9, pp. 1945–51, Sep. 2005.
- [102] Z. Sun, J. Gong, L. Wu, and P. Li, "Imaging lipid droplet fusion and growth.," *Methods Cell Biol.*, vol. 116, pp. 253–68, Jan. 2013.
- [103] S.-O. Olofsson, L. Andersson, L. Håversen, C. Olsson, S. Myhre, M. Rutberg, R. Mobini, L. Li, E. Lu, J. Borén, and P. Boström, "The formation of lipid droplets: possible role in the development of insulin resistance/type 2 diabetes.," *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*, vol. 85, no. 5, pp. 215–8, Nov. 2011.
- [104] T. C. Walther and R. V. Farese, "Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 81, no. 1, pp. 687–714, Jul. 2012.
- [105] P. C. Kienesberger, M. Oberer, A. Lass, and R. Zechner, "Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions.," *J. Lipid Res.*, vol. 50 Suppl, pp. S63–8, Apr. 2009.
- [106] W. Chen, B. Chang, L. Li, and L. Chan, "Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease.," *Hepatology*, vol. 52, no. 3, pp. 1134–42, Sep. 2010.
- [107] M. A. Welte, "Expanding Roles for Lipid Droplets.," *Curr. Biol.*, vol. 25, no. 11, pp. R470–R481, Jun. 2015.
- [108] R. Zechner, R. Zimmermann, T. O. Eichmann, S. D. Kohlwein, G. Haemmerle, A. Lass, and F. Madeo, "FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling.," *Cell Metab.*, vol. 15, no. 3, pp. 279–91, Mar. 2012.

- [109] J. M. Goodman, "The gregarious lipid droplet.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 42, pp. 28005–9, Oct. 2008.
- [110] S. Murphy, S. Martin, and R. G. Parton, "Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1791, no. 6, pp. 441–7, Jun. 2009.
- [111] P. Liu, R. Bartz, J. K. Zehmer, Y. Ying, and R. G. W. Anderson, "Rab-regulated membrane traffic between adiposomes and multiple endomembrane systems.," *Methods Enzymol.*, vol. 439, pp. 327–37, Jan. 2008.
- [112] P. O. Seglen, "Preparation of isolated rat liver cells.," *Methods Cell Biol.*, vol. 13, pp. 29–83, Jan. 1976.
- [113] M. N. Berry and D. S. Friend, "High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study.," *J. Cell Biol.*, vol. 43, no. 3, pp. 506–20, Dec. 1969.
- [114] P. P. E. G.-L. C. innovación y S. F. FG-UCM, *CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS. APLICACIONES EN MEDICINA REGENERATIVA*. Editorial Visión Libros, 2013.
- [115] J. A. Ontko, L. W. Perrin, and L. S. Horne, "Isolation of hepatocellular lipid droplets: the separation of distinct subpopulations.," *J. Lipid Res.*, vol. 27, no. 10, pp. 1097–103, Oct. 1986.
- [116] N. E. Wolins, B. Rubin, and D. L. Brasaemle, "TIP47 associates with lipid droplets.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 7, pp. 5101–8, Mar. 2001.
- [117] R. A. Igal, P. Wang, and R. A. Coleman, "Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA.," *Biochem. J.*, vol. 324 ( Pt 2, pp. 529–34, Jun. 1997.
- [118] M. Paar, C. Jüngst, N. A. Steiner, C. Magnes, F. Sinner, D. Kolb, A. Lass, R. Zimmermann, A. Zumbusch, S. D. Kohlwein, and H. Wolinski, "Remodeling of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 14, pp. 11164–73, Mar. 2012.
- [119] D. M. Muoio, T. M. Lewin, P. Wiedmer, and R. a Coleman, "Acyl-CoAs are functionally channeled in liver: potential role of acyl-CoA synthetase.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 279, no. 6, pp. E1366–E1373, 2000.
- [120] D. Barneda, A. Frontini, S. Cinti, and M. Christian, "Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the 'browning' of white adipose tissues.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1831, no. 5, pp. 924–33, May 2013.
- [121] Y. Ding, L. Yang, S. Zhang, Y. Wang, Y. Du, J. Pu, G. Peng, Y. Chen, H. Zhang, J. Yu, H. Hang, P. Wu, F. Yang, H. Yang, A. Steinbüchel, and P. Liu, "Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets.," *J. Lipid Res.*, vol. 53, no. 3, pp. 399–411, Mar. 2012.
- [122] Y. Chen, Y. Ding, L. Yang, J. Yu, G. Liu, X. Wang, S. Zhang, D. Yu, L. Song, H. Zhang, C. Zhang, L. Huo, C. Huo, Y. Wang, Y. Du, H. Zhang, P. Zhang, H. Na, S. Xu,

- Y. Zhu, Z. Xie, T. He, Y. Zhang, G. Wang, Z. Fan, F. Yang, H. Liu, X. Wang, X. Zhang, M. Q. Zhang, Y. Li, A. Steinbüchel, T. Fujimoto, S. Cichello, J. Yu, and P. Liu, "Integrated omics study delineates the dynamics of lipid droplets in *Rhodococcus opacus* PD630.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 2, pp. 1052–64, Jan. 2014.
- [123] S. R. Pyper, N. Viswakarma, S. Yu, and J. K. Reddy, "PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer.," *Nucl. Recept. Signal.*, vol. 8, p. e002, Jan. 2010.
- [124] J. Zhao, L. Zhao, H. Yang, and L. Zhang, "[Effects of PPAR-alpha activation on oleic acid-induced steatosis and expression of heme oxygenase-1 in HepG2 cells].," *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, vol. 21, no. 3, pp. 218–21, Mar. 2013.
- [125] V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt, "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.," *Electrophoresis*, vol. 9, no. 6, pp. 255–62, Jun. 1988.
- [126] E. Mortz, T. N. Krogh, H. Vorum, and A. Görg, "Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis.," *Proteomics*, vol. 1, no. 11, pp. 1359–63, Dec. 2001.
- [127] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann, "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.," *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 5, pp. 850–8, Mar. 1996.
- [128] A. Lundby and J. V. Olsen, "GeLCMS for in-depth protein characterization and advanced analysis of proteomes.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 753, pp. 143–55, Jan. 2011.
- [129] P. Anand, S. Cermelli, Z. Li, A. Kassan, M. Bosch, R. Sigua, L. Huang, A. J. Ouellette, A. Pol, M. A. Welte, and S. P. Gross, "A novel role for lipid droplets in the organismal antibacterial response.," *Elife*, vol. 1, p. e00003, Jan. 2012.
- [130] A. Amar-Costesec, M. Wibó, D. Thinès-Sempoux, H. Beaufay, and J. Berthet, "Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. IV. Biochemical, physical, and morphological modifications of microsomal components induced by digitonin, EDTA, and pyrophosphate.," *J. Cell Biol.*, vol. 62, no. 3, pp. 717–45, Sep. 1974.
- [131] R. Lehner, Z. Cui, and D. E. Vance, "Subcellular localization, developmental expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase.," *Biochem. J.*, vol. 338 ( Pt 3, pp. 761–8, Mar. 1999.
- [132] H. Wang, D. Gilham, and R. Lehner, "Proteomic and lipid characterization of apolipoprotein B-free luminal lipid droplets from mouse liver microsomes: implications for very low density lipoprotein assembly.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 45, pp. 33218–26, Nov. 2007.
- [133] D. Gilham, M. Alam, W. Gao, D. E. Vance, and R. Lehner, "Triacylglycerol hydrolase is localized to the endoplasmic reticulum by an unusual retrieval sequence where it participates in VLDL assembly without utilizing VLDL lipids as substrates.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 2, pp. 984–96, Feb. 2005.



- [134] J. Chang, S. Oikawa, H. Iwahashi, E. Kitagawa, I. Takeuchi, M. Yuda, C. Aoki, Y. Yamada, G. Ichihara, M. Kato, and S. Ichihara, "Expression of proteins associated with adipocyte lipolysis was significantly changed in the adipose tissues of the obese spontaneously hypertensive/NDmcr-cp rat.," *Diabetol. Metab. Syndr.*, vol. 6, no. 1, p. 8, Jan. 2014.
- [135] S. P. Sanghani, P. C. Sanghani, M. A. Schiel, and W. F. Bosron, "Human carboxylesterases: an update on CES1, CES2 and CES3.," *Protein Pept. Lett.*, vol. 16, no. 10, pp. 1207–14, Jan. 2009.
- [136] B. S. Kaphalia and G. A. Ansari, "Purification and characterization of rat hepatic microsomal low molecular weight fatty acid ethyl ester synthase and its relationship to carboxylesterases.," *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, vol. 15, no. 3, pp. 165–71, Jan. 2001.
- [137] B. S. Kaphalia, K. A. Mericle, and G. A. S. Ansari, "Mechanism of differential inhibition of hepatic and pancreatic fatty acid ethyl ester synthase by inhibitors of serine-esterases: in vitro and cell culture studies.," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 200, no. 1, pp. 7–15, Oct. 2004.
- [138] M. K. Danks, C. L. Morton, E. J. Krull, P. J. Cheshire, L. B. Richmond, C. W. Naeve, C. A. Pawlik, P. J. Houghton, and P. M. Potter, "Comparison of activation of CPT-11 by rabbit and human carboxylesterases for use in enzyme/prodrug therapy.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 5, no. 4, pp. 917–24, Apr. 1999.
- [139] E. H. Harrison, "Lipases and carboxylesterases: possible roles in the hepatic utilization of vitamin A.," *J. Nutr.*, vol. 130, no. 2S Suppl, p. 340S–344S, Feb. 2000.
- [140] R. Lehner and D. E. Vance, "Cloning and expression of a cDNA encoding a hepatic microsomal lipase that mobilizes stored triacylglycerol.," *Biochem. J.*, vol. 343 Pt 1, pp. 1–10, Oct. 1999.
- [141] J. Adler and I. Parmryd, "Quantifying colocalization by correlation: The pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient," *Cytom. Part A*, vol. 77, no. 8, pp. 733–742, 2010.
- [142] B. Zhao, B. J. Fisher, R. W. St Clair, L. L. Rudel, and S. Ghosh, "Redistribution of macrophage cholesteryl ester hydrolase from cytoplasm to lipid droplets upon lipid loading.," *J. Lipid Res.*, vol. 46, no. 10, pp. 2114–21, Oct. 2005.
- [143] S. Bencharit, C. C. Edwards, C. L. Morton, E. L. Howard-Williams, P. Kuhn, P. M. Potter, and M. R. Redinbo, "Multisite promiscuity in the processing of endogenous substrates by human carboxylesterase 1.," *J. Mol. Biol.*, vol. 363, no. 1, pp. 201–14, Oct. 2006.
- [144] S. Bencharit, C. L. Morton, Y. Xue, P. M. Potter, and M. R. Redinbo, "Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 349–56, May 2003.
- [145] C. D. Fleming, S. Bencharit, C. C. Edwards, J. L. Hyatt, L. Tsurkan, F. Bai, C. Fraga, C. L. Morton, E. L. Howard-Williams, P. M. Potter, and M. R. Redinbo, "Structural insights into drug processing by human carboxylesterase 1: tamoxifen, mevastatin, and inhibition by benzil.," *J. Mol. Biol.*, vol. 352, no. 1, pp. 165–77, Sep. 2005.

- [146] T. Satoh and M. Hosokawa, "The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 38, pp. 257–88, Jan. 1998.
- [147] B. Yan, D. Yang, M. Brady, and A. Parkinson, "Rat kidney carboxylesterase. Cloning, sequencing, cellular localization, and relationship to rat liver hydrolase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 47, pp. 29688–96, Nov. 1994.
- [148] P. A. Frey, S. A. Whitt, and J. B. Tobin, "A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases.," *Science*, vol. 264, no. 5167, pp. 1927–30, Jun. 1994.
- [149] M. Cygler, J. D. Schrag, J. L. Sussman, M. Harel, I. Silman, M. K. Gentry, and B. P. Doctor, "Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins.," *Protein Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 366–82, Mar. 1993.
- [150] V. W. Dolinsky, D. Gilham, M. Alam, D. E. Vance, and R. Lehner, "Triacylglycerol hydrolase: role in intracellular lipid metabolism.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 61, no. 13, pp. 1633–51, Jul. 2004.
- [151] R. S. Holmes, L. A. Cox, and J. L. VandeBerg, "Mammalian carboxylesterase 3: comparative genomics and proteomics.," *Genetica*, vol. 138, no. 7, pp. 695–708, Jul. 2010.
- [152] R. Lehner and R. Verger, "Purification and characterization of a porcine liver microsomal triacylglycerol hydrolase.," *Biochemistry*, vol. 36, no. 7, pp. 1861–8, Feb. 1997.
- [153] M. Robbi and H. Beaufay, "The COOH terminus of several liver carboxylesterases targets these enzymes to the lumen of the endoplasmic reticulum.," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 30, pp. 20498–503, Oct. 1991.
- [154] A. Kukalev, Y. Nord, C. Palmberg, T. Bergman, and P. Percipalle, "Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 3, pp. 238–44, Mar. 2005.
- [155] P. Percipalle, A. Jonsson, D. Nashchekin, C. Karlsson, T. Bergman, A. Guialis, and B. Daneholt, "Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 8, pp. 1725–34, Apr. 2002.
- [156] P. Percipalle, N. Fomproix, K. Kylberg, F. Miralles, B. Bjorkroth, B. Daneholt, and N. Visa, "An actin-ribonucleoprotein interaction is involved in transcription by RNA polymerase II.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 11, pp. 6475–80, May 2003.
- [157] H. Jiang, J. He, S. Pu, C. Tang, and G. Xu, "Heat shock protein 70 is translocated to lipid droplets in rat adipocytes upon heat stimulation.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1771, no. 1, pp. 66–74, Jan. 2007.
- [158] S. Cermelli, Y. Guo, S. P. Gross, and M. A. Welte, "The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot.," *Curr. Biol.*, vol. 16, no. 18, pp. 1783–95, Sep. 2006.



- [159] H.-C. Wan, R. C. N. Melo, Z. Jin, A. M. Dvorak, and P. F. Weller, "Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies.," *FASEB J.*, vol. 21, no. 1, pp. 167–78, Jan. 2007.
- [160] H. Yang, Z. Zhou, H. Zhang, M. Chen, J. Li, Y. Ma, and B. Zhong, "Shotgun proteomic analysis of the fat body during metamorphosis of domesticated silkworm (*Bombyx mori*).," *Amino Acids*, vol. 38, no. 5, pp. 1333–42, May 2010.
- [161] H. Zhang, Y. Wang, J. Li, J. Yu, J. Pu, L. Li, H. Zhang, S. Zhang, G. Peng, F. Yang, and P. Liu, "Proteome of skeletal muscle lipid droplet reveals association with mitochondria and apolipoprotein a-I.," *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 10, pp. 4757–68, Oct. 2011.
- [162] P. Zhang, H. Na, Z. Liu, S. Zhang, P. Xue, Y. Chen, J. Pu, G. Peng, X. Huang, F. Yang, Z. Xie, T. Xu, P. Xu, G. Ou, S. O. Zhang, and P. Liu, "Proteomic study and marker protein identification of *Caenorhabditis elegans* lipid droplets.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 11, no. 8, pp. 317–28, Aug. 2012.
- [163] S. Larsson, S. Resjö, M. F. Gomez, P. James, and C. Holm, "Characterization of the lipid droplet proteome of a clonal insulin-producing  $\beta$ -cell line (INS-1 832/13).," *J. Proteome Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 1264–73, Mar. 2012.
- [164] Z. Li, K. Thiel, P. J. Thul, M. Beller, R. P. Kühnlein, and M. A. Welte, "Lipid droplets control the maternal histone supply of *Drosophila* embryos.," *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 22, pp. 2104–13, Nov. 2012.
- [165] Z. Li, M. R. Johnson, Z. Ke, L. Chen, and M. A. Welte, "*Drosophila* lipid droplets buffer the H2Av supply to protect early embryonic development.," *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 13, pp. 1485–91, Jul. 2014.
- [166] M. Ueno, W.-J. Shen, S. Patel, A. S. Greenberg, S. Azhar, and F. B. Kraemer, "Fat-specific protein 27 modulates nuclear factor of activated T cells 5 and the cellular response to stress.," *J. Lipid Res.*, vol. 54, no. 3, pp. 734–43, Mar. 2013.
- [167] Z. E. Floyd, J. S. Trausch-Azar, E. Reinstein, A. Ciechanover, and A. L. Schwartz, "The nuclear ubiquitin-proteasome system degrades MyoD.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 25, pp. 22468–75, Jun. 2001.
- [168] W. Martin, "Archaeobacteria (Archaea) and the origin of the eukaryotic nucleus.," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 8, no. 6, pp. 630–7, Dec. 2005.
- [169] S. A. Whelan and G. W. Hart, "Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation.," *Circ. Res.*, vol. 93, no. 11, pp. 1047–58, Nov. 2003.
- [170] C. Butkinaree, K. Park, and G. W. Hart, "O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1800, no. 2, pp. 96–106, Mar. 2010.
- [171] J. A. Hanover, M. W. Krause, and D. C. Love, "The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1800, no. 2, pp. 80–95, Mar. 2010.

- [172] M. Jínek, J. Rehwinkel, B. D. Lazarus, E. Izaurralde, J. A. Hanover, and E. Conti, "The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin  $\alpha$ ," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 11, no. 10, pp. 1001–7, Oct. 2004.
- [173] T. J. Wallace, E. M. Kodsí, T. B. Langston, M. R. Gergis, and W. M. Grogan, "Mutation of residues 423 (Met/Ile), 444 (Thr/Met), and 506 (Asn/Ser) confer cholesteryl esterase activity on rat lung carboxylesterase. Ser-506 is required for activation by cAMP-dependent protein kinase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 35, pp. 33165–74, Aug. 2001.
- [174] S. D. G. Marshall, J. J. Putterill, K. M. Plummer, and R. D. Newcomb, "The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*," *J. Mol. Evol.*, vol. 57, no. 5, pp. 487–500, Nov. 2003.
- [175] W. D. Dettbarn, Z. P. Yang, and D. Milatovic, "Different role of carboxylesterases in toxicity and tolerance to paraoxon and DFP.," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 119–120, pp. 445–54, May 1999.
- [176] D. Yang, R. E. Pearce, X. Wang, R. Gaedigk, Y.-J. Y. Wan, and B. Yan, "Human carboxylesterases HCE1 and HCE2: ontogenic expression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 77, no. 2, pp. 238–47, Jan. 2009.
- [177] M. Robbi, H. Beaufay, and J. N. Octave, "Nucleotide sequence of cDNA coding for rat liver pl 6.1 esterase (ES-10), a carboxylesterase located in the lumen of the endoplasmic reticulum.," *Biochem. J.*, vol. 269, no. 2, pp. 451–8, Jul. 1990.
- [178] S. Ghosh and W. M. Grogan, "Rapid three-step purification of a hepatic neutral cholesteryl ester hydrolase which is not the pancreatic enzyme.," *Lipids*, vol. 26, no. 10, pp. 793–8, Oct. 1991.
- [179] R. S. Holmes, M. W. Wright, S. J. F. Lalederkind, L. A. Cox, M. Hosokawa, T. Imai, S. Ishibashi, R. Lehner, M. Miyazaki, E. J. Perkins, P. M. Potter, M. R. Redinbo, J. Robert, T. Satoh, T. Yamashita, B. Yan, T. Yokoi, R. Zechner, and L. J. Maltais, "Recommended nomenclature for five mammalian carboxylesterase gene families: human, mouse, and rat genes and proteins.," *Mamm. Genome*, vol. 21, no. 9–10, pp. 427–41, Oct. 2010.
- [180] R. C. Augusteyn, J. de Jersey, E. C. Webb, and B. Zerner, "On the homology of the active-site peptides of liver carboxylesterases.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 171, no. 1, pp. 128–37, Jan. 1969.
- [181] T. Tsujita and H. Okuda, "Fatty acid ethyl ester synthase in rat adipose tissue and its relationship to carboxylesterase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 33, pp. 23489–94, Nov. 1992.
- [182] S. M. Maté, J. P. Layerenza, and A. Ves-Losada, "Incorporation of arachidonic and stearic acids bound to L-FABP into nuclear and endonuclear lipids from rat liver cells.," *Lipids*, vol. 42, no. 7, pp. 589–602, Jul. 2007.
- [183] A. Ves-Losada and R. R. Brenner, "Long-chain fatty Acyl-CoA synthetase enzymatic activity in rat liver cell nuclei.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 159, no. 1, pp. 1–6, Jun. 1996.

- [184] A. J. Aitchison, D. J. Arsenault, and N. D. Ridgway, "Nuclear-localized CTP:phosphocholine cytidyltransferase  $\alpha$  regulates phosphatidylcholine synthesis required for lipid droplet biogenesis.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 26, no. 16, pp. 2927–38, Aug. 2015.
- [185] R. W. Ledeen and G. Wu, "Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling.," *J. Lipid Res.*, vol. 49, no. 6, pp. 1176–86, Jun. 2008.
- [186] S. M. Actis Dato, A. Catala, and R. R. Brenner, "Circadian rhythm of fatty acid desaturation in mouse liver.," *Lipids*, vol. 8, no. 1, pp. 1–6, Jan. 1973.
- [187] B. B. Knowles, C. C. Howe, and D. P. Aden, "Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen.," *Science*, vol. 209, no. 4455, pp. 497–9, Jul. 1980.
- [188] A. L. Schwartz, S. E. Fridovich, B. B. Knowles, and H. F. Lodish, "Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line.," *J. Biol. Chem.*, vol. 256, no. 17, pp. 8878–81, Sep. 1981.
- [189] N. B. Javitt, "Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids.," *FASEB J.*, vol. 4, no. 2, pp. 161–8, Mar. 1990.
- [190] K. C. Nguyen, W. G. Willmore, and A. F. Tayabali, "Cadmium telluride quantum dots cause oxidative stress leading to extrinsic and intrinsic apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells.," *Toxicology*, vol. 306, pp. 114–23, Apr. 2013.
- [191] N. Li, H. Fu, Y. Tie, Z. Hu, W. Kong, Y. Wu, and X. Zheng, "miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells.," *Cancer Lett.*, vol. 275, no. 1, pp. 44–53, Mar. 2009.
- [192] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.," *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, Dec. 1983.
- [193] G. Blobel and V. R. Potter, "Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield.," *Science*, vol. 154, no. 3757, pp. 1662–5, Dec. 1966.
- [194] C. B. Kasper, "Isolation and properties of the nuclear envelope.," *Methods Enzymol.*, vol. 31, pp. 279–92, Jan. 1974.
- [195] J. FOLCH, M. LEES, and G. H. SLOANE STANLEY, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.," *J. Biol. Chem.*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, May 1957.
- [196] W. Chen P. S., Toriibara T. Y., "Microdetermination of Phosphorus." [Online]. Available: <http://libra.msra.cn/Publication/23887079/microdetermination-of-phosphorus>. [Accessed: 29-Aug-2015].
- [197] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, "Protein measurement with the Folin phenol reagent.," *J. Biol. Chem.*, vol. 193, no. 1, pp. 265–75, Nov. 1951.

- [198] L. A. Kelley and M. J. E. Sternberg, "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server.," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 3, pp. 363–71, Jan. 2009.
- [199] J. D. Thompson, D. G. Higgins, and T. J. Gibson, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 22, pp. 4673–80, Nov. 1994.